



Impact de l'infection à *Helicobacter pylori* sur la maladie d'Alzheimer

Claire Baudron Roubaud

► To cite this version:

Claire Baudron Roubaud. Impact de l'infection à *Helicobacter pylori* sur la maladie d'Alzheimer. Immunologie. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0076 . tel-01325235

HAL Id: tel-01325235

<https://theses.hal.science/tel-01325235>

Submitted on 2 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École doctorale des Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : microbiologie-immunologie

Par Claire ROUBAUD BAUDRON

**Impact de l'infection à *Helicobacter pylori* sur la maladie
d'Alzheimer**

Sous la direction de : Professeur Nathalie Salles

Soutenue le 23 Juin 2014

Membres du jury :

Madame le Professeur Muriel Rainfray	Président
Madame le Docteur Delphine Boche	Rapporteur
Madame le Professeur Fati Nourhashemi	Rapporteur
Monsieur le Professeur Marc Verny	Examineur
Monsieur le Professeur Jacques Micheau.....	Examineur
Monsieur le Professeur Colm O'Morain	Examineur
Monsieur le Professeur Francis Mégraud	Examineur
Madame le Professeur Nathalie Salles.....	Directeur de thèse

A Guilhem

A Martin, Jean et Amicie

A mes parents, ma famille et mes amis

Au Professeur Nathalie Salles qui a dirigé ce travail avec bienveillance et m'a encouragée tout au long de ma thèse. Ton enthousiasme et ta détermination sont un exemple pour moi. Je me réjouis de travailler à tes côtés.

Au Professeur Francis Mégraud qui m'a accueillie dans son laboratoire. Je vous remercie pour vos encouragements, votre soutien et la confiance que vous m'avez accordée.

Au Professeur Muriel Rainfray qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je vous remercie pour votre accueil chaleureux dans votre service et votre aide précieuse pour que ces années de recherche se déroulent dans les meilleures conditions possibles. Votre investissement dans la prise en charge du sujet âgé atteint de démence est un exemple pour moi.

Aux Professeurs Fati Nourhashemi et Delphine Boche qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à la relecture de ce travail.

Au Professeur Marc Verny qui a accepté de juger ce travail. Je vous remercie de m'avoir donné envie de devenir gériatre.

Aux Professeur Colm O'Morain et Jacques Micheau d'avoir accepté de juger ce travail.

A Valérie Fénelon, Lucie Blaszczyk, Yoon Cho, Susanna Pietropaolo, Nathalie Macrez et Thierry Amédée pour leur aide et leur patience. Je vous remercie de m'avoir ouvert les portes des neurosciences.

A Lucie Chambonnier et toutes les personnes de l'unité INSERM U853 qui m'ont aidée et soutenue tout au long de cette thèse. Grâce à vous, le travail se fait dans les meilleures conditions possibles.

A Geneviève Pinganaud et mes internes de m'avoir donné du temps sur la dernière ligne droite.

Summary

Helicobacter pylori infection seems to play a critical role in extra-gastric diseases including Alzheimer's dementia (AD). Chronic *H. pylori* infection could worsen AD lesions via atherosclerosis and inflammation. In a cohort study with 603 non-institutionalized individuals aged 65 and older followed from 1989 to 2008, dementia was more prevalent in the *H. pylori*-positive group at baseline compared to non-infected group. After 20 years of follow-up, *H. pylori* infection was determined to be a risk factor for developing dementia after controlling for AD risk factors. In a second study, including 53 AD patients, *H. pylori* infection was associated with a more pronounced cognitive impairment. Homocysteine levels were positively correlated to cerebrovascular lesions and to *H. pylori* immunoglobulin levels. To bypass possible confounding biases concerning socio-economic conditions for instance, we evaluated the impact of *H. pylori* infection on the brain of non-AD predisposed C57BL/6J mice. After an 18-month infection, *H. pylori* SS1 and *H. felis* induced a significant gastric inflammation but no brain A β deposit was observed in their brain and the infection did not lead to neuroinflammation. To go further, we studied the impact of *Helicobacter* species infection on cerebral lesions and behaviour of AD transgenic (APPswe/PS1dE9) mice and their wild type littermates. *H. pylori* infection was associated with an increased number of brain amyloid plaques, but not with an increased neuroinflammation nor a worsening behaviour at 6 and 10 months of age. Although epidemiological studies provided new elements for an association between AD and *H. pylori* infection, animal model studies did not display a worsening behaviour or an increased neuroinflammation despite an increased number of amyloid plaques. More studies are needed to firmly conclude that there is an association between *H. pylori* infection and AD.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Alzheimer's disease, animal model, APPswe/PS1dE9, behaviour.

Résumé

L'infection à *Helicobacter pylori* est responsable d'une inflammation gastrique chronique qui pourrait contribuer à l'apparition ou l'aggravation de pathologies extradiigestives comme la maladie d'Alzheimer (MA). A partir des données de la cohorte PAQUID explorant les facteurs de risque de démence dans une population de patients de plus de 65 ans, nous avons montré que la prévalence de la démence augmentait chez les sujets infectés. Après 20 ans de suivi, l'infection à *H. pylori* était associée à une augmentation de l'incidence de démence après ajustement aux facteurs de risque connus de MA. Dans une deuxième étude incluant 53 patients atteints de MA, l'infection à *H. pylori* était associée à des performances cognitives plus sévères et le taux d'homocystéine était positivement corrélé aux lésions cérébrovasculaires et au taux d'anticorps anti-*H. pylori*. Pour s'affranchir de possibles biais confondant comme le niveau socio-économique, nous avons ensuite évalué l'impact de l'infection à *H. pylori* sur le cerveau de souris sauvages (C57BL/6J) non prédisposées à la MA. Après 18 mois d'infection, alors que l'infection était associée à une inflammation gastrique importante, il n'a pas été retrouvé de plaque amyloïde ou de majoration de la neuroinflammation. Pour aller plus loin, nous avons étudié l'impact de l'infection à *H. pylori* sur le comportement et les lésions cérébrales de souris transgéniques prédisposées à la MA (APPswe/PS1dE9). Après 6 mois d'infection, les souris transgéniques présentaient plus de plaques amyloïdes sans majoration de la neuroinflammation ni des troubles du comportement. Bien que les études épidémiologiques apportent de nouveaux éléments en faveur d'une association entre la MA et l'infection à *H. pylori*, les études sur modèle animal ne mettent pas en évidence de majoration des troubles cognitifs ni de la neuroinflammation des souris infectées malgré une majoration du nombre de plaques amyloïdes. D'autres études sont nécessaires pour conclure à une association.

Mots-clés : *Helicobacter pylori*, maladie d'Alzheimer, APPswe/PS1dE9, neuroinflammation, cognition et comportement

SOMMAIRE

SOMMAIRE	5
ABREVIATIONS	7
LISTES DES FIGURES	8
LISTES DES TABLEAUX	9
AVANT-PROPOS	10
I. INTRODUCTION	11
1. La maladie d'Alzheimer, vers une piste infectieuse ?	11
A. La question initiale	11
B. Les différentes hypothèses physiopathologiques	13
1) L'hypothèse cholinergique	13
2) La théorie amyloïde	14
3) L'hypothèse inflammatoire	17
4) L'hypothèse vasculaire	19
5) Apolipoprotéine E, un trait d'union entre ces différentes hypothèses ?	21
C. L'hypothèse infectieuse	23
1) Herpes Simplex Virus	23
2) <i>Chlamydia pneumoniae</i>	25
3) Les spirochètes	26
4) La maladie d'Alzheimer : une maladie à prions ?	28
5) Inflammation systémique	29
2. <i>Helicobacter pylori</i>	31
D. Généralités	32
1) Données épidémiologiques	32
2) Caractéristiques bactériologiques	33
3) <i>Helicobacter pylori</i> et pathologies gastriques	35
4) Méthodes diagnostiques	37
5) Traitement de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i>	39
E. <i>Helicobacter pylori</i> et les pathologies extra gastriques	39
1) Les pathologies cardiovasculaires	40

2) Les pathologies hématologiques.....	42
F. <i>Helicobacter pylori</i> et la maladie d'Alzheimer	43
1) Etudes cas –témoins	43
2) Etudes de cohorte	44
3) Etudes d'intervention.....	45
II. L'INFECTION A <i>HELICOBACTER PYLORI</i> EST-ELLE ASSOCIEE A UNE AUGMENTATION DE L'INCIDENCE DES DEMENCES ?	49
III. L'INFECTION A <i>HELICOBACTER PYLORI</i> EST-ELLE ASSOCIEE A UNE AUGMENTATION DE LA SEVERITE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ?	51
IV. L'INFECTION A <i>HELICOBACTER</i> SPP INDUIT-ELLE UNE AMYLOÏDOPATHIE CEREBRALE ? ETUDE SUR MODELE ANIMAL	53
V. L'INFECTION A <i>HELICOBACTER</i> SPP AGGRAVE-T-ELLE LES TROUBLES DU COMPORTEMENT ET LES LESIONS CEREBRALES DE SOURIS TRANSGENIQUES PREDISPOSEES A LA MALADIE D'ALZHEIMER ?.....	55
VI. DISCUSSION	57
VII. ANNEXES.....	62
VIII. RÉFÉRENCES.....	64

ABREVIATIONS

ACh	Acétylcholine
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
ApoE	Apolipoprotéine E
AVC	Accident vasculaire cérébral
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CRP	« <i>C-reactive protein</i> »
DNF	Dégénérescence neurofibrillaire
ELISA	« <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> »
HES	Hématoxyline éosine safran
HTA	Hypertension artérielle
HSV	Herpes Simplex Virus
Ig	Immunoglobuline
IPP	Inhibiteur de pompe à protons
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LCR	Liquide céphalorachidien
LPS	Lipopolysaccharide
MALT	« <i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i> »
PCR	“ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
PrP ^{Sc}	Protéines prion scrapie
pTau	Protéine Tau phosphorylée
PTI	Purpura thrombopénique immunologique
PrP ^C	Protéine prion cellulaire
SNC	Système nerveux central
Tg	Transgénique
TLR	“ <i>Toll like receptor</i> ”
TNF	“ <i>Tumor Necrosis Factor</i> ”
WT	“ <i>Wild type</i> ”

LISTES DES FIGURES

Figure 1. Quel est le lien entre la maladie d'alzheimer et les dépôts amyloïdes et neurofibrillaires ?.....	12
Figure 2. Métabolisme de l'Amyloïd Precursor Protein (APP).....	14
Figure 3. La cascade amyloïde.....	16
Figure 4. Herpes Simplex Virus et maladie d'Alzheimer, étude PAQUID.	25
Figure 5. Inflammation systémique et déclin cognitif.	30
Figure 6. Prévalence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> dans le monde.	32
Figure 7. Principaux facteurs de colonisation et de virulence de <i>Helicobacter pylori</i>	35
Figure 8. Pathologies gastro-duodénales induites par l'infection à <i>Helicobacter pylori</i>	37

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1. Fréquence des différents allèles de l'Apolipoprotéine E chez des patients atteints de maladie d'Alzheimer et des patients témoins.....	21
Tableau 2. Effet du génotype de l'Apolipoprotéine E sur l'âge de survenue de la maladie d'Alzheimer	22
Tableau 3. Principaux résultats des études concernant l'association entre l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> et la maladie d'Alzheimer.....	48

AVANT-PROPOS

Une récente étude de prévalence à l'échelle internationale (85) a conclu qu'environ 24 millions de personnes dans le monde souffraient de démences en 2001 et que ce chiffre pourrait être de 42 millions en 2020 et de 81 millions en 2040. La maladie d'Alzheimer est la première cause de démence chez la personne âgée. Après 100 ans de recherche, son étiologie reste inconnue ce qui nécessite d'imaginer de nouvelles hypothèses de recherche.

Mes travaux ont porté sur l'hypothèse infectieuse de la maladie d'Alzheimer, en particulier sur l'impact de l'infection à *Helicobacter pylori* sur la sévérité de cette démence. Ce travail de thèse a tenté de répondre à plusieurs questions.

1. L'infection à *Helicobacter pylori* est-elle associée à une augmentation de l'incidence des démences ?
2. L'infection à *Helicobacter pylori* est-elle associée à une augmentation de la sévérité de la maladie d'Alzheimer ?
3. L'infection à *Helicobacter* spp induit-elle une amyloïdopathie cérébrale ? Etude sur modèle animal.
4. L'infection à *Helicobacter* spp aggrave-t-elle les troubles du comportement et les lésions cérébrales de souris transgéniques prédisposées à la maladie d'Alzheimer ?

La première partie de ce mémoire est consacrée à un état des lieux des connaissances sur les différentes hypothèses étiologiques de la maladie d'Alzheimer, en particulier l'hypothèse infectieuse et l'infection à *H. pylori* et son rôle possible dans des pathologies extra-digestives.

I. INTRODUCTION

1. La maladie d'Alzheimer, vers une piste infectieuse ?

A. La question initiale

Il y a un peu plus de 100 ans, dans un asile de Francfort sur le Main, le Docteur Aloïs Alzheimer décrivait pour la première fois le cas d'une patiente de 51 ans qui présentait une perte de mémoire des événements récents d'aggravation progressive, une désorientation temporo-spatiale, des hallucinations auditives et des troubles du comportement. Ces troubles étaient associés à une perte d'autonomie. La patiente était anosognosique. Le décès de la patiente est survenu 4 ans et demi après le début des troubles, la patiente était alors totalement dépendante (10, 11). L'examen post mortem du cerveau de la patiente retrouva une atrophie cérébrale diffuse avec des modifications vasculaires. La coloration à l'argent de Bielschowsky, révéla des fibrilles intraneuronales (dégénérescences neurofibrillaires). L'auteur décrit une « miliaire diffuse » causée par le dépôt d'une substance réfractaire à la coloration (plaques amyloïdes). Il remarque également la disparition de nombreux neurones. Aloïs Alzheimer s'est alors demandé si les lésions histologiques observées (plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires) étaient responsables de cette perte neuronale ou bien une conséquence. Cent ans plus tard la question reste sans réponse, comme illustrée dans la **figure 1** issue d'une revue de la littérature de Lansbury & Lashuel (164).

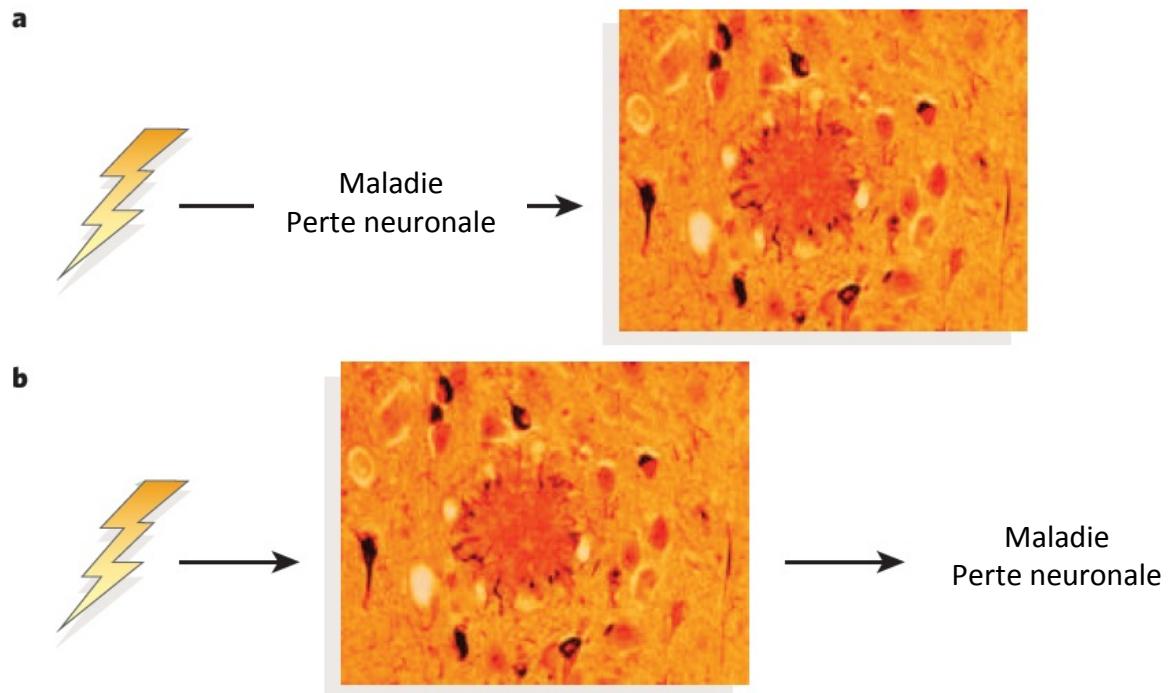


Figure 1. Quel est le lien entre la maladie d'alzheimer et les dépôts amyloïdes et neurofibrillaires ? Deux hypothèses sont ici proposées. **a**, hypothèse 1 : la maladie neurodégénérative est responsable du dépôt des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires, cette agrégation de protéines n'a pas de rôle causal. **b**, hypothèse 2 : les dépôts protéiques sont responsables de la neurodégénérescence. Ces images représentent des coupes de cerveau d'un patient atteint par la maladie d'Alzheimer et montrent une plaque amyloïde entourée de dégénérescences neurofibrillaires intraneuronales d'après Lansbury & Lashuel (164).

Il existe deux formes de maladie d'Alzheimer. Les formes familiales ne représentent que 1 à 5% des maladies d'Alzheimer. Le mode de transmission est autosomique dominant. Les mutations génétiques responsables de ces formes familiales concernent les gènes codant pour l'*Amyloid Precursor Protein* (APP) (107) et les présénellines 1 et 2 (PSEN1 et PSEN2) (173, 270), chacune impliquée dans la production du peptide A β pathologique. Ces formes familiales présentent les mêmes lésions anatomopathologiques que la forme sporadique (courante) de la maladie d'Alzheimer. Les lésions histologiques retrouvées sont caractérisées par la présence de plaques séniles et de dégénérescences neurofibrillaires mais également par la présence d'angiopathie amyloïde, d'atrophie cérébrale, des altérations des synapses ainsi qu'une diminution de la substance blanche, une perte neuronale et l'activation de la neuroinflammation (218).

A ce jour, le nombre et la nature des facteurs déclenchant la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer (éclair dans la figure 1) ne sont pas encore connus, raison pour laquelle aucun traitement actuel ne permet de guérir les patients atteints ou de ralentir significativement la progression de la maladie. Un certain nombre de facteurs de risque ont été identifiés. Certains ne sont pas modifiables comme l'âge (85), le sexe (83), la présence de l'allèle $\epsilon 4$ de l'Apolipoprotéine E (83) ou les antécédents de traumatismes crâniens (286). D'autres facteurs liés au mode de vie (activité physique (120), exercice intellectuel (304), consommation d'alcool (17)) et aux comorbidités semblent influencer l'incidence de la maladie d'Alzheimer. La découverte de ces facteurs de risque représente des pistes de recherche pour déterminer l'origine de la maladie d'Alzheimer. En effet de multiples hypothèses ont été proposées afin d'expliquer la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Les principales sont décrites dans ce manuscrit ci après.

B. Les différentes hypothèses physiopathologiques

1) L'hypothèse cholinergique

L'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur des systèmes nerveux central et périphérique. L'hypothèse cholinergique a émergé dans les années 70 à partir de résultats anatomopathologiques. En effet, l'activité de l'enzyme responsable de la production de l'ACh (la choline acétyltransférase) est diminuée dans le cortex et les hippocampes des cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer (61, 239). La neurotransmission cholinergique s'altère au cours de l'évolution de la maladie d'Alzheimer du fait d'une dégénérescence spécifique du noyau basal de Meynert (322) impliqué dans les phénomènes de mémorisation (58).

A l'exemple de la maladie de Parkinson et du déficit en L-DOPA, l'utilisation d'inhibiteurs de la dégradation de l'ACh (inhibiteur de l'acétylcholine estérase) avait pour but l'augmentation de ce neurotransmetteur et l'obtention de meilleures performances mnésiques comme le suggéraient les études animales utilisant différents produits cholinergiques (58). Plusieurs inhibiteurs de l'acétylcholine estérase ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché mais les résultats chez l'homme ont été décevants, avec des améliorations très modérées des scores cognitifs et comportementaux, sans que l'on puisse en retenir une efficacité clinique certaine. Aucune étude n'a permis de montrer que ces traitements permettaient de prévenir la

survenue de la maladie, de faire régresser les symptômes de la maladie ou encore d'arrêter la progression.

2) La théorie amyloïde

La découverte de formes familiales génétiques de la maladie d'Alzheimer est le point de départ de cette théorie. A partir des données génétiques, Hardy *et al.* ont proposé la théorie de la cascade amyloïde en 1992 (124). En effet, comme les lésions histologiques étaient comparables entre les formes familiales et sporadiques, les auteurs sont partis du principe que la physiopathologie devait être commune et basée sur les protéines APP et présénellines. C'est le clivage anormal, dit amyloïdogénique, de l'APP par les enzymes β et γ sécrétases qui provoquerait la formation de peptides β -amyloïde ($A\beta$) de taille variable. La **figure 2** d'après Thinakaran *et al.* (293) illustre ce clivage anormal.

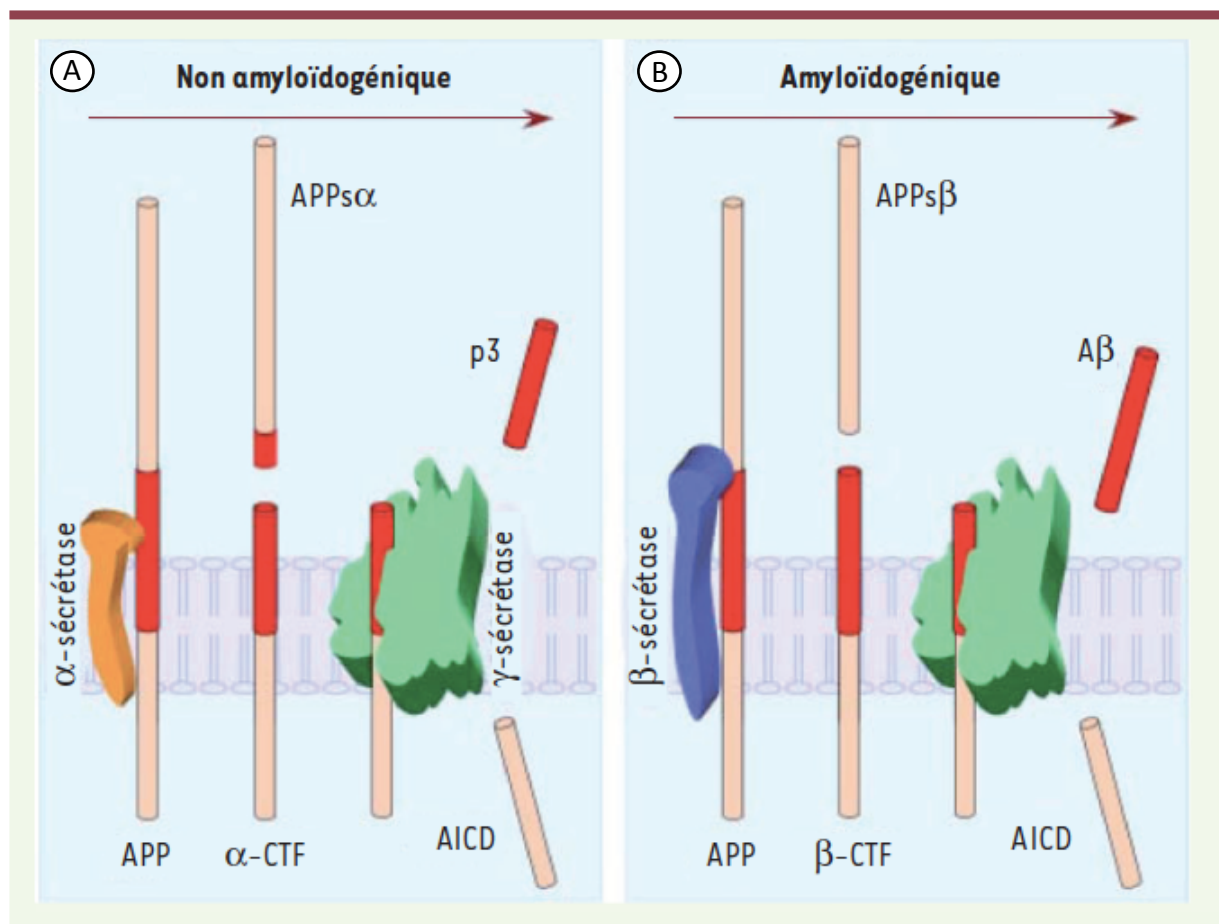


Figure 2. Métabolisme de l'Amyloid Precursor Protein (APP) selon les voies non amyloïdogénique (A) ou amyloïdogénique (B). La voie B est dite amyloïdogénique car les complexes β et γ -sécrétases clivent l'APP en donnant le peptide $A\beta$. CTF, C Terminal Fragment ; AICD, APP Intra Cellular Domain. D'après Thinakaran *et al.* (293)

Les dépôts amyloïdes sous forme de plaques extracellulaires seraient responsables d'une toxicité directe sur les neurones et déclencheraient la formation des dégénérescences neurofibrillaires (123, 272) (**Figure 3**). Ces dernières sont caractérisées par l'hyperphosphorylation anormale des protéines tau dont le rôle habituel est de stabiliser les microtubules pour le transport intracellulaire et la croissance axonale. Les protéines tau hyperphosphorylées (pTau) s'agrègent entre elles pour donner les dégénérescences neurofibrillaires.

Cependant il n'a pas été retrouvé de corrélation entre le nombre de plaques amyloïdes et la sévérité des déficits cognitifs chez des patients atteints de maladie d'Alzheimer (18, 42, 57, 62, 105, 246, 253), de plus une autre étude de corrélation entre le déclin cognitif et les données anatomopathologiques a retrouvé que 33% des patients non déments présentaient autant de plaques amyloïdes que des patients atteints de maladie d'Alzheimer (116). Cependant, les dépôts amyloïdes pourraient précéder le déclin cognitif, ce qui expliquerait leur présence dans le cerveau de patients encore asymptomatiques (218).

La surproduction et l'accumulation progressives de peptides A β sous forme d'oligomères solubles pourraient être neurotoxiques (317) et incriminées dans l'altération de la structure, la fonction et la plasticité des synapses bien avant la neurodégénérescence et la formation des plaques amyloïdes. En effet, une diminution de la densité des synapses et leur dysfonctionnement sont corrélés au déclin cognitif (126, 269).

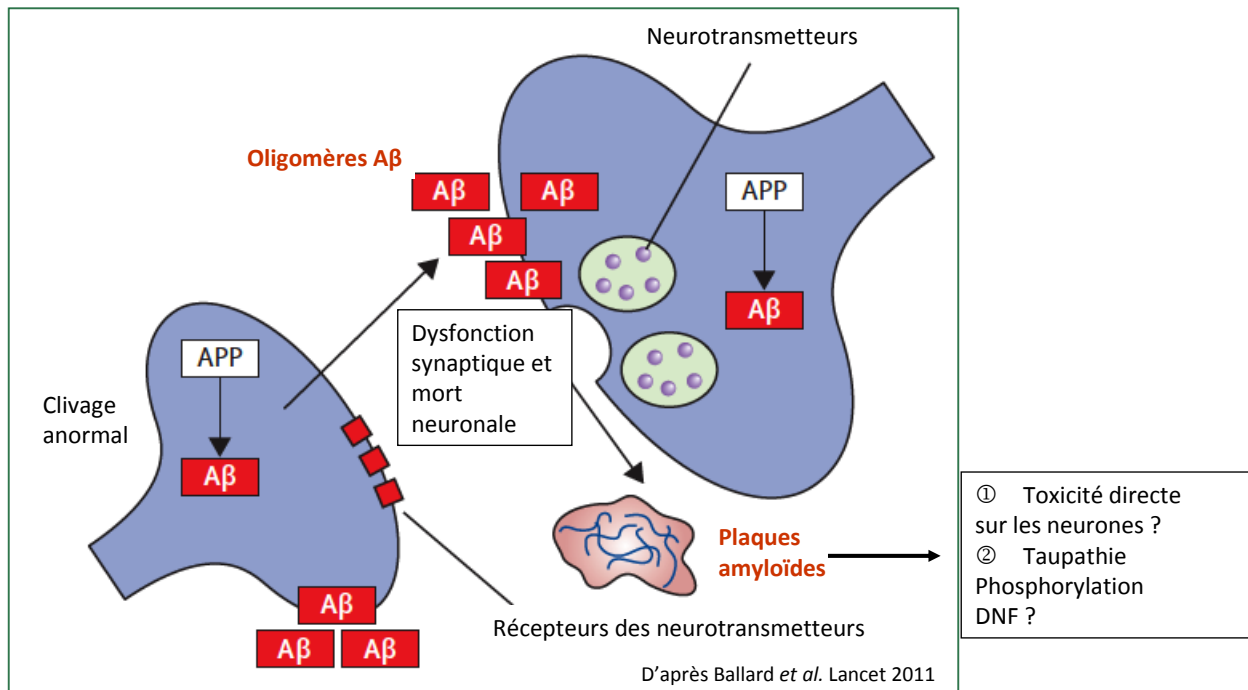


Figure 3. La cascade amyloïde. L'hypothèse amyloïde débute par le clivage anormal de l'*Amyloid Precursor Protein* (APP) en produisant des peptides amyloïdes (Aβ) qui s'agrègeraient sous forme de plaques amyloïdes possiblement responsables d'une neurotoxicité favorisant la formation des dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Des éléments plus récents à cette hypothèse proposent que ces oligomères solubles puissent altérer la fonction des synapses. D'après Ballard et al. (24).

Cette théorie amyloïde a été à l'origine de nombreux essais cliniques. Les inhibiteurs des β- et γ-sécrétase (112), l'immunisation active ou passive contre le peptide Aβ (130) et les inhibiteurs de son agrégation (4, 163, 252) sont en cours d'évaluation chez l'homme. Aucun n'a encore montré une efficacité clinique (essai de phase III) sur l'évolution de la maladie (24). Des essais récents de phase III sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-peptide Aβ n'ont pas montré d'efficacité clinique (70, 263).

Certains chercheurs se sont également demandés si l'hyperphosphorylation de la protéine Tau pouvait être à l'origine de la cascade amyloïde (200). La présence des dégénérescences neurofibrillaires semble bien corrélée au déclin cognitif (218). En perturbant le fonctionnement des microtubules, l'hyperphosphorylation des protéines Tau induit une altération du transport axonal, une dysfonction synaptique et finalement une neurodégénérescence. Les dégénérescences neurofibrillaires ne sont pas spécifiques de la maladie d'Alzheimer et se retrouvent dans d'autres pathologies neurodégénératives (les taupathies). Des molécules inhibant la phosphorylation de la protéine Tau ou son agrégation sont actuellement en cours d'évaluation (171).

La théorie amyloïde a été décrite il y a maintenant plus de 20 ans, de nombreuses équipes de recherche ont approfondi les connaissances sur la physiopathologie du peptide A β . Cette présence pathologique de peptides A β peut être due, soit à un défaut de clairance, soit à une augmentation de production. Une étude publiée en 2010 a comparé la production et la clairance du peptide A β dans le liquide céphalorachidien (LCR) de 12 patients atteints par la maladie d'Alzheimer et 12 patients témoins. Les auteurs ont retrouvé que la maladie d'Alzheimer était associée à une diminution de la clairance du peptide A β de 30% par rapport aux patients témoins. Ces résultats sont en faveur d'un rôle majeur du défaut de dégradation du peptide A β dans le développement de la maladie d'Alzheimer (201). La dégradation de ce peptide repose sur l'activation de la neuroinflammation et le rôle de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

3) L'hypothèse inflammatoire

Au cours de la maladie d'Alzheimer, certains marqueurs de la neuroinflammation sont augmentés dans les zones cérébrales atteintes. Les patients indemnes de démence qui présentent des plaques amyloïdes cérébrales présentent de moindres signes de neuroinflammation (183). L'imagerie cérébrale utilisant la tomographie par émission de positrons retrouve une corrélation entre le déficit cognitif et la présence de cellules microgliales activées (sans corrélation avec la quantité de plaques amyloïdes) (73) chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer. L'activation de la neuroinflammation pourrait être, soit à l'origine ou secondaire à la maladie d'Alzheimer avec un rôle plus ou moins bénéfique (37). En effet, l'activation de la neuroinflammation pourrait participer à la clairance du peptide A β (254).

Parmi les acteurs de la neuroinflammation, les cellules microgliales jouent un rôle important (240). Elles représentent 10% des cellules du système nerveux central (SNC). Elles interagissent en permanence avec leur environnement grâce à leurs nombreux prolongements ramifiés jouant ainsi le rôle de sentinelle (221). En interagissant avec les neurones elles pourraient également avoir un rôle de soutien en particulier nutritif. L'agression du SNC (infection, ischémie ou maladie neurodégénérative), produit un

changement morphologique avec un raccourcissement et un épaississement de leur prolongements et une augmentation de la taille de leur corps cellulaire ; parallèlement, elles augmentent la production de récepteurs membranaires et de cytokines pro-inflammatoires. Dès la fin des années 80, Griffin *et al.* (114) ont émis l'hypothèse que l'activation des cellules microgliales dans la maladie d'Alzheimer pourrait avoir un rôle délétère et participer à la progression de la maladie plutôt qu'être protecteur. Bien que les cellules microgliales possèdent plusieurs récepteurs capables de se fixer au peptide A β , leur activité phagocytaire est déficitaire, empêchant l'élimination de dépôts amyloïdes.

Les astrocytes jouent un rôle important dans la production et l'apport d'acides aminés aux neurones, ils participent à la régulation cérébrovasculaire, c'est-à-dire aux échanges entre les vaisseaux intracérébraux et les neurones et modulent la fonction synaptique. Des modèles de souris transgéniques (Tg) (surexpression ou « *knock out* » de certaines protéines spécifiques astrocytaires) ont montré que les astrocytes jouaient un rôle dans la neuroprotection mais également dans la neurodégénérescence. Dans la maladie d'Alzheimer, on les retrouve sous une forme activée caractérisée par une hypertrophie des prolongements et du corps cellulaire autour des plaques amyloïdes.

A partir de ces données, Griffin (113) décrit "l'hypothèse cytokinique". Des facteurs environnementaux, génétiques ou encore la présence de comorbidités pourraient induire une activation microgliale et astrocytaire provoquant la production excessive de cytokines comme l'interleukine 1 (IL-1) et S100B. A leur tour ces cytokines induiraient la production du peptide A β et une neurotoxicité. La neurotoxicité majorerait l'activation astrocytaire et microgliale. Cette hypothèse décrit donc un cercle vicieux induit par un événement initial responsable de l'activation de la neuroinflammation.

Des études épidémiologiques ont montré que l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) pendant plusieurs années diminuait le risque de développer une maladie d'Alzheimer (81, 315). Alors que plusieurs études montrent que l'utilisation d'AINS induit une amélioration histologique voire cognitive chez des souris Tg prédisposées à la maladie d'Alzheimer, aucune étude chez l'homme n'a permis de conclure à une efficacité des AINS (202). Une récente méta-analyse portant sur 14 études comparant l'efficacité des AINS, des corticoïdes et de l'aspirine par rapport à un placebo dans le traitement de la maladie

d'Alzheimer n'a pas permis de conclure à une efficacité de ces traitements sur le déclin cognitif (141). L'injection périspinale hebdomadaire pendant 6 mois d'etanercept, molécule inhibitrice du « *Tumor Necrosis Factor* » (TNF)-alpha, a permis dans une étude pilote prospective sur 12 patients atteints de maladie d'Alzheimer de montrer une régression des troubles cognitifs en particulier des troubles phasiques (295). Un essai clinique est actuellement en cours (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01716637).

Les cellules microgliales et astrocytaires jouent donc un rôle important dans la maladie d'Alzheimer, même si il est encore difficile de distinguer leur rôle protecteur, en participant à la circonscription et à la clairance des plaques amyloïdes, de leur rôle néfaste par l'emballlement de la sécrétion de cytokines responsables d'une neurotoxicité. Un autre acteur important dans la clairance du peptide Aβ est la barrière hémato-encéphalique.

4) L'hypothèse vasculaire

Depuis plus de 15 ans, plusieurs études épidémiologiques ont souligné l'importance des facteurs de risque cardiovasculaire dans la maladie d'Alzheimer (50, 128, 152, 279). Plusieurs études montrent que certains facteurs de risque cardiovasculaire influencent l'incidence de la maladie d'Alzheimer comme le diabète (181), l'obésité (35), la consommation de tabac (169), l'hypercholestérolémie (152) ou encore l'inactivité physique (120). En reprenant 3 études interventionnelles (SHEP Systolic Hypertension in Elderly Program, SYST-EUR systolic Hypertension in Europe et SCOPE Study on Cognition and Prognosis in the Elderly), McGuinness *et al.* (203) montrent que le traitement de l'hypertension artérielle permet de diminuer l'incidence des démences y compris l'incidence de la maladie d'Alzheimer. Les facteurs de risque cardiovasculaire pourraient augmenter le risque de survenue de maladie d'Alzheimer ou accélérer le déclin cognitif de patients atteints de maladie d'Alzheimer par la survenue de microhémorragies cérébrales, de lacunes et de lésions de la substance blanche, effets bien visualisés en imagerie par résonance magnétique (IRM) (314). La présence de ces anomalies de la substance blanche est associée au déclin cognitif et au risque de développer une démence y compris une maladie d'Alzheimer (65).

Alors que, classiquement, les démences étaient qualifiées de « démence vasculaire » ou de « démence d'Alzheimer » selon des critères bien précis (critères NINDS-AIREN (National

Institute of Neurological Disorders and Stroke and Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences) (255) et NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (71, 204)) respectivement)), la plupart des syndrômes démentiels associent une part vasculaire et une part neurodégénérative, appelée « démence mixte », en particulier dans la population âgée. Pour certains, le rôle important des facteurs de risque cardiovasculaire remet en cause la théorie amyloïde (66). En effet leur présence serait responsable d'une hypoperfusion cérébrale chronique. Il a en effet été mis en évidence grâce à des études de neuroimagerie que l'hypoperfusion cérébrale précéderait l'apparition de la maladie d'Alzheimer (7). Le fonctionnement et la survie des neurones sont liés au débit sanguin cérébral. L'hypoperfusion cérébrale serait à l'origine des lésions neurodégénératives. Pour d'autres auteurs, les hypothèses « amyloïde » et « vasculaire » ne seraient pas incompatibles et on pourrait aisément penser que les 2 mécanismes soient synergiques (314). En d'autres termes que la présence de facteurs de risque cardiovasculaire, en diminuant le flux sanguin cérébral et en provoquant des lésions vasculaires cérébrales, augmenterait le déclin cognitif lié au processus neurodégénératif.

La plupart des lésions vasculaires décrites dans les études anatomopathologiques de patients atteints de maladie d'Alzheimer concernent les petits vaisseaux (infarctus lacunaires, microangiopathie) (313), de plus la maladie d'Alzheimer est associée à un dépôt important du peptide A β autour de ces petits vaisseaux. L'interface entre les vaisseaux et le cerveau s'appelle la barrière hémato-encéphalique (BHE). Un dysfonctionnement de la BHE pourrait induire ou tout du moins participer à la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (31). La BHE est constituée de cellules endothéliales cérébrales, de pieds astrocytaires et de péricytes, ainsi que de cellules musculaires lisses enchâssées dans la membrane basale. Les cellules endothéliales sont jointives du fait de la présence de jonctions serrées, elles contrôlent les échanges entre les compartiments cérébral et vasculaire. Les astrocytes et les péricytes participent à l'adaptation des apports de substances nutritives du sang vers le cerveau et l'élimination des déchets du cerveau vers le sang. Comme nous l'avons vu précédemment c'est l'élimination du peptide A β plutôt que sa production qui est altérée dans la maladie d'Alzheimer (201), or c'est la BHE qui permet le transport du peptide A β entre le sang et le cerveau (111). Deux récepteurs LRP1 (« *low density lipoprotein receptor-related protein-1* ») et RAGE (« *receptor for advanced glycation end-products* ») participent respectivement à la

sortie et l'entrée du peptide A β dans le sang. Chez un patient atteint de maladie d'Alzheimer, on retrouve une diminution de l'expression de LRP-1 et une augmentation de l'expression de RAGE favorisant la diminution de l'élimination du peptide A β (69). Un essai thérapeutique utilisant un inhibiteur de RAGE est actuellement en cours (259).

Les facteurs de risque cardiovasculaire en altérant le fonctionnement/intégrité de la BHE, en provoquant des AVC ou une hypoperfusion cérébrale pourraient donc participer à la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

Toutes ces hypothèses ne semblent pas exclusives. L'apolipoprotéine E (ApoE) pourrait être un trait d'union entre ces différentes théories.

5) Apolipoprotéine E, un trait d'union entre ces différentes hypothèses ?

Il existe 3 allèles du gène codant pour l'ApoE : ApoE2, ApoE3 et ApoE4. L'ApoE3 est le plus fréquent (50-90%) alors que l'ApoE4 et l'ApoE2 sont plus rarement retrouvés (5-35% et 1-5%). Plus de 50% des patients atteints de maladie d'Alzheimer portent au moins 1 exemplaire de l'allèle ApoE4. Le risque de développer une maladie d'Alzheimer est multiplié par 3 et 15 lorsqu'on est porteur d'1 allèle et 2 allèles ApoE4, respectivement. La présence de l'allèle ApoE4 avance l'âge d'apparition de la maladie d'Alzheimer (101). En revanche la présence de l'allèle ApoE2 est protecteur (83) (**tableaux 1 et 2**).

Tableau 1. Fréquence des différents allèles de l'Apolipoprotéine E chez des patients atteints de maladie d'Alzheimer et des patients témoins, d'après Farrer *et al.* (83)

Fréquence de l'allèle	%		
	Témoins	Maladie d'Alzheimer	
		Sporadique	Familiale
Allèle			
ApoE2	8	4	2
ApoE3	78	50	48
ApoE4	14	37	50
Porteurs ApoE4	26	64	80

Tableau 2. Effet du génotype de l'Apolipoprotéine E sur l'âge de survenue de la maladie d'Alzheimer, d'après Genin *et al.* (101)

Génotype	%	
	75 ans	85 ans
ApoE4/E4	30	60
ApoE4/E3	8	30
ApoE3/E3	2	10

L'apolipoprotéine E a été décrite dans les années 70 comme un transporteur de lipides en particulier dans le cerveau, elle contribue à l'entretien et la réparation des neurones. La présence de l'allèle ApoE4 augmente la production du peptide A β et diminue son élimination au niveau de la BHE. Par le biais des péricytes, l'ApoE4 altère la perméabilité de la BHE (337). De plus elle a un effet toxique direct sur les neurones (dysfonction mitochondriale, hyperphosphorylation de la protéine Tau...) (185).

En ce qui concerne l'élimination du peptide A β , l'ApoE interagit également avec les cellules microgliales pour faciliter la phagocytose (168). La présence des allèles ApoE3 et ApoE2 favoriserait la phagocytose et l'élimination du peptide A β .

Le rôle majeur de cette protéine a particulièrement été souligné dans une étude de Cramer *et al.* publiée dans le journal *Science* en 2012 (55). En utilisant un agoniste d'un récepteur capable d'induire la transcription du gène *apoE* (bexarotene) chez des souris Tg (APP-PS1), les auteurs ont montré une amélioration des troubles comportementaux et une diminution des dépôts amyloïdes. Malheureusement, ces résultats n'ont pas été reproduits dans au moins 4 autres publications (87, 245, 292, 307).

D'autres facteurs de risque génétiques ont récemment été identifiés grâce à des études de grande ampleur qui comparent le génome de patients atteints par la maladie d'Alzheimer et des patients sains (« *Genome-wide association study* » GWAS). Ainsi Alperovitch *et al.* ont réalisé cette comparaison en 2013 sur 17,008 patients « Alzheimer » et 37,154 témoins et ont identifié une dizaine de nouveaux gènes qui représentent tous de nouvelles pistes de recherche (6).

C. L'hypothèse infectieuse

Alzheimer et ses collègues évoquaient déjà le rôle possible d'un microorganisme dans la physiopathologie de la maladie qu'il venait de décrire (86). Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (51) ou *Treponema pallidum* (214) sont en effet 2 micro-organismes connus pour donner des démences. Devant le rôle primordial de l'inflammation dans la maladie d'Alzheimer, l'hypothèse infectieuse est une piste de recherche actuelle. Dès 1977, Tomlinson évoquait la possibilité d'une origine virale (298). Depuis le sujet est débattu et plusieurs agents pathogènes ont été incriminés que nous allons passer en revue.

1) Herpes Simplex Virus

L'Herpes Simplex Virus (HSV), virus à ADN double brins), pourrait être lié à la maladie d'Alzheimer pour trois raisons principales. Tout d'abord il a un tropisme neurologique. Après une primo-infection, le plus souvent survenue pendant l'enfance et bénigne, le virus est capable de migrer le long des cellules nerveuses et persister sous forme latente dans le système nerveux périphérique. Dans de rares cas, l'infection peut atteindre le système nerveux central et provoquer une encéphalite herpétique. Les régions cérébrales concernées par l'infection sont les lobes frontotemporaux, régions les plus affectées dans la maladie d'Alzheimer. Ensuite, dans certaines circonstances il peut se réactiver et donner de nouveau des symptômes. Enfin sa prévalence est élevée (environ 90% de la population adulte) et il est ubiquitaire.

En 1991, Jamieson *et al.* détectent pour la première fois la présence d'ADN viral de HSV par « *Polymerase Chain Reaction* » (PCR) dans le cerveau post mortem de patients âgés dans une proportion comparable entre ceux atteints de maladie d'Alzheimer (9/15) et ceux indemnes de démence (14/21). Cet ADN se retrouvait dans les régions frontotemporales et était absent des régions occipitales. En revanche la PCR était négative dans les cerveaux de patients jeunes (137, 138). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études (27, 33, 110, 216). Dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer Wozniak *et al.* retrouvent la présence d'ADN viral au sein même des plaques amyloïdes (327). Itzhaki *et al.* ont recherché une susceptibilité génétique qui pourrait conduire une personne à développer une maladie

d'Alzheimer alors qu'elle est infectée par HSV. Ainsi ils ont montré que sur un total de 90 échantillons de cerveaux (46 patients atteints de maladie d'Alzheimer et 44 patients sains), l'ADN de HSV était plus fréquent dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer lorsqu'ils étaient porteurs de l'allèle ApoE4 par rapport aux autres patients (135, 136), mais ces résultats n'ont pas été confirmés par Beffert *et al.* (30).

A partir de la cohorte PAQUID, qui concerne environ 3777 patients âgés de plus de 65 ans vivant à domicile dans les départements de la Gironde et de la Dordogne et suivis pendant 15 ans, Letenneur *et al.* ont montré que parmi les 512 patients indemnes de démence qui avaient bénéficié d'une prise de sang, ceux qui présentaient une réactivation herpétique (présence d'anticorps IgM anti-HSV) avaient un risque augmenté de développer une démence après ajustement sur l'âge, le sexe, le niveau d'éducation et le statut ApoE (**Figure 4**). Cette étude ne retrouvait pas d'interaction entre la présence de l'allèle ApoE4 ou d'IgM anti-HSV et le risque de démence (172). *A contrario*, Mancuso *et al.* ont retrouvé que les taux d'anticorps anti-HSV étaient comparables entre 83 patients atteints de maladie d'Alzheimer et 51 patients témoins, mais positivement corrélés avec le volume du cortex. Les auteurs évoquent l'hypothèse d'un rôle protecteur de ces anticorps (193).

Plusieurs études réalisées sur des cultures cellulaires (neurones de rat, de souris et lignées cellulaires humaines de glioblastome) ont montré que la présence de HSV augmentait la production de protéines Tau phosphorylées (8, 170, 326), de peptide A β (241, 265, 326), une modification du clivage d'APP (64, 134, 326) et l'apparition d'anomalies neuronales conduisant à la mort neuronale (331). L'utilisation d'acyclovir (traitement anti-herpétique) (324) ainsi que d'immunoglobines polyvalentes (325) sur des cultures cellulaires en présence de HSV diminue l'accumulation du peptide A β et l'activité de phosphorylation de la protéine Tau. Wozniak *et al.* ont induit l'apparition de plaques amyloïdes dans le cerveau de souris sauvages BALB/c après les avoir infectées par HSV (326). Martin *et al.* ont également montré que l'infection par HSV de souris BALB/c induisait une activation de la neuroinflammation et une neurodégénérescence (199). En revanche, ces résultats n'ont pas été confirmés par Guzman-Sanchez *et al.* qui ont utilisé des souris C57Bl6 (118).

Même si un nombre croissant d'études apporte des arguments pour une implication de HSV dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, aucune étude d'intervention chez l'homme n'a encore été conduite.

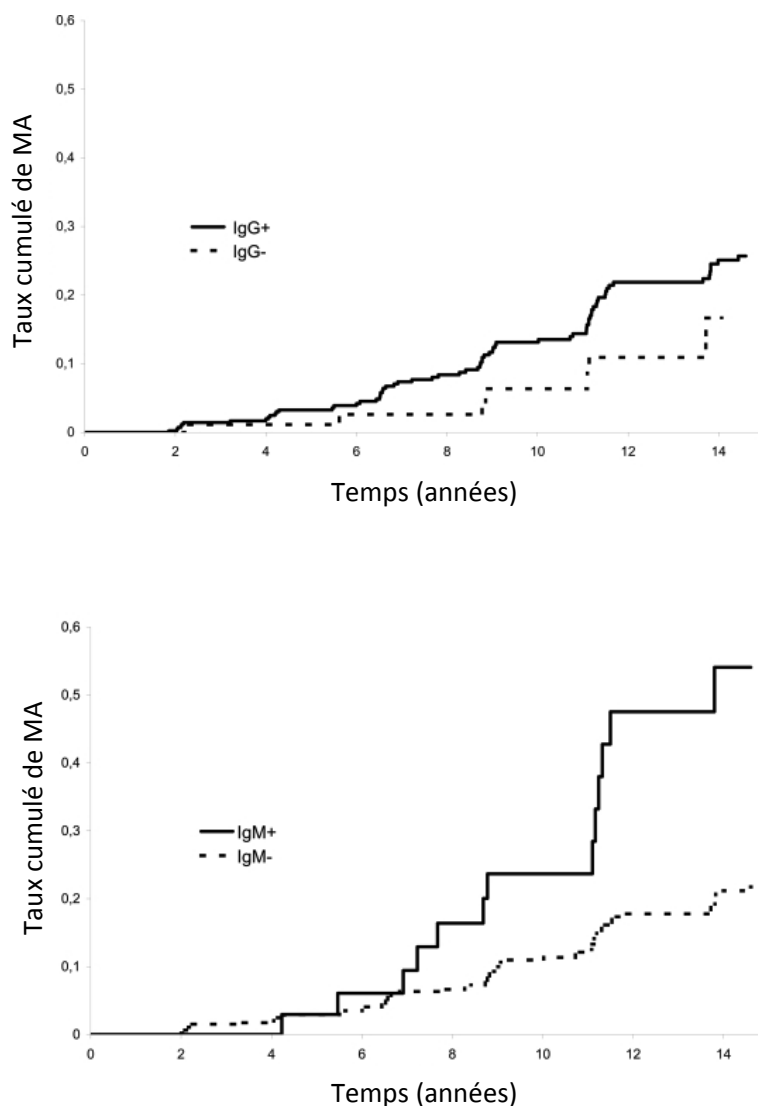


Figure 4. Herpes Simplex Virus et maladie d'Alzheimer, étude PAQUID. Taux d'incidence cumulée de maladie d'Alzheimer en fonction de la présence d'anticorps anti HSV (IgG en haut et IgM en bas). MA, maladie d'Alzheimer. D'après Letenneur *et al.* (172)

2) *Chlamydia pneumoniae*

Chlamydia pneumoniae est une bactérie Gram négative intra cellulaire qui se transmet par voie aérienne et provoque des infections des voies aériennes (bronchites et pneumopathies). Son implication dans des pathologies extra-respiratoires a également été évoquée dans l'athérosclérose (274) ou les AVC (77).

Dans une étude *post mortem* réalisée à la fin des années 90, Balin *et al.* retrouvaient la présence d'ADN de *C. pneumoniae* dans 90% (17/19) des cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer et seulement dans 5% (1/19) de patients témoins (23). D'autres études ont confirmé ces résultats et retrouvé la présence de *C. pneumoniae* dans des astrocytes, des cellules microgliales et des neurones proches des lésions histologiques de la maladie

d'Alzheimer (102, 121). Leur présence était d'autant plus importante que les patients étaient porteurs de l'allèle ApoE4 (103). Ces résultats n'ont pas été reproduits dans d'autres études (106, 223, 251, 291)

Dans une étude *in vitro*, Boelen *et al.* (39) ont montré que les neurones et les astrocytes pouvaient être infectés par *C. pneumoniae* et mourir par nécrose à la différence des cellules microgliales. La présence d'ADN de *C. pneumoniae* était plus élevée dans le LCR de patients atteints de maladie d'Alzheimer par rapport à des patients témoins, mais les auteurs n'ont pas retrouvé d'association entre la présence d'ADN bactérien et les taux du peptide A β et des protéines Tau phosphorylées (228).

Dans un modèle animal, l'infection de souris sauvages BALB/c par *C. pneumoniae* par voie respiratoire est associée à l'apparition de plaques amyloïdes et d'une réaction astrocytaire, les dépôts amyloïdes augmentant avec la durée de l'infection (175). L'infection était réalisée avec une souche de *C. pneumoniae* isolée à partir du prélèvement cérébral d'un patient atteint de maladie d'Alzheimer. Boelen *et al.* ne confirment pas ces résultats (38).

La tétracycline et la rifampycine qui sont des antibiotiques actifs sur *C. pneumoniae*, pourraient empêcher l'accumulation de peptide A β (90, 297). A partir de ces données, Loeb *et al.* ont conduit une étude d'intervention testant l'utilisation de la doxycycline associée à la rifampicine *versus* placebo chez 100 patients atteints de maladie d'Alzheimer et ont comparé leur déclin cognitif. A 6 mois, le déclin cognitif était moins important dans le groupe traité comparé au groupe placebo. Néanmoins, les auteurs n'ont pas trouvé de relation avec la présence de *C. pneumoniae*. L'effet sur le déclin cognitif serait lié à l'effet des antibiotiques eux-mêmes plus qu'à leur action sur une infection à *C. pneumoniae* (178).

Les résultats obtenus dans les études anatomo-pathologiques chez l'homme ou dans les études animales étaient donc contradictoires et nécessitent encore d'autres travaux.

3) Les spirochètes

Les spirochètes sont des bactéries Gram négatives de l'environnement. Il existe plus de 200 espèces différentes de spirochètes. Ils sont responsables de nombreuses pathologies humaines : maladie de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), syphilis (*Treponema pallidum*), leptospirose (*Leptospira* spp)... La plaque dentaire est très riche en spirochètes de type

Treponema spp qui peuvent parfois être responsables d'infection grave comme l'angine de Vincent.

Les spirochètes ont un tropisme neurologique important. En 1913, Noguchi et More décrivaient pour la première fois la présence de *Treponema pallidum* dans le cerveau d'un patient atteint d'une « paralysie générale », c'est-à-dire d'une méningo-encéphalite syphilitique (« neurosyphilis ») caractérisée par un syndrome démentiel et une atrophie cérébrale en particulier dans les zones fronto-temporales (224). Au niveau histologique, les spirochètes se rassemblent sous formes de plaques mais peuvent également migrer sous forme de filaments dans le cortex. Le nombre de ces lésions est corrélé à l'atrophie cérébrale. Morphologiquement ces 2 formes ressemblent aux plaques séniles et aux dégénérescences neurofibrillaires. Des études anatomopathologiques retrouvent, dans les cerveaux de patients atteints de neurosyphilis, la présence de peptide A β dans des dépôts amyloïdes (212).

Dans les formes avancées de maladie de Lyme, infection induite par la présence de *B. burgdorferi*, on retrouve des syndromes démentiels caractérisés par une atrophie cérébrale et une activation de la neuroinflammation (82, 184, 213, 268). McDonald *et al.* ont isolé pour la première fois *B. burgdorferi* à partir d'un cerveau de patient atteint de maladie d'Alzheimer (184).

Cette observation soulève l'hypothèse que de nombreux spirochètes pourraient être responsables de démence voire de maladie d'Alzheimer.

Plusieurs études ont retrouvé la présence de spirochètes dans le LCR ou dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer. Toutes ces études sont reprises dans une revue de la littérature de Miklossy *et al.* (212). Au total 110 cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer et 37 cerveaux de patients témoins ont été analysés par différentes méthodes (immunohistochimie, PCR, western blot). Des spirochètes (tous types confondus) étaient présents dans 90% des cerveaux de patients maladie d'Alzheimer et absents dans tous les cerveaux témoins. Dans une autre série concernant 127 cerveaux, *B. burgdorferi* était présent 13 fois plus souvent dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer que dans le cerveau des patients témoins.

In vitro, en présence de *B. burgdorferi*, des cellules neuronales et astrocytaires de rat augmentent la production d'APP et de pTau (215).

Toutefois, des études similaires sérologiques ou histologiques *post mortem* n'ont pas permis de confirmer ces résultats (96, 117, 197, 205, 227).

A la différence de la maladie d'Alzheimer, la prévalence de la maladie de Lyme n'a pas une répartition géographique homogène. Elle se concentre dans des zones géographiques bien précises correspondant à celles de son vecteur. En revanche, les spirochètes de la cavité buccale sont, eux, distribués de manière homogène dans le monde et pourraient par leur possible neurotropisme contribuer à des processus dégénératifs (212).

4) La maladie d'Alzheimer : une maladie à prions ?

Les maladies à prions (« *protein infectious only* ») regroupent un ensemble de maladies neurodégénératives. L'évolution de ces maladies est toujours fatale (21). Elles sont caractérisées par l'accumulation de protéines prion scrapie (PrP^{Sc}), protéines neurotoxiques. PrP^{Sc} est la conséquence d'un repliement anormal (transconformation) de la protéine prion cellulaire (PrP^C) non pathologique que l'on retrouve chez l'homme. On considère la PrP^{Sc} comme un agent infectieux car elle est capable de modifier la conformation de la PrP^C (247), responsable des encéphalopathies spongiformes transmissibles comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

De récentes études expérimentales ont montré que le peptide A β pourrait se comporter comme la PrP^{Sc}. En effet l'injection de peptide A β chez des souris Tg exprimant la protéine APP humaine induit le dépôt de peptide A β plus précocement que chez les souris non injectées (74). Cette injection peut également induire la formation de dépôts amyloïdes chez des rats qui expriment le gène *app* et également la phosphorylation de la protéine Tau dans le cerveau de souris Tg (40). Stohr *et al.*, en imagerie par bioluminescence, ont permis de montrer qu'effectivement le peptide A β était capable de se propager au sein du parenchyme cérébral et de se comporter comme un prion (282). Encore plus récemment Pietri *et al.* ont mis en avant une possible cible thérapeutique commune aux maladies à prions et la maladie d'Alzheimer : PDK1 (243). Cette protéine est capable de diminuer l'activité de l'alpha sécrétase qui joue un rôle important dans la maladie d'Alzheimer (**figure 2**) et les maladies à prions. L'association entre les facteurs de risque génétique de la maladie d'Alzheimer comme le gène de l'ApoE4 et les maladies à prions reste controversée (14, 333).

Cette récente découverte de possible comportement « prion-like » du peptide A β ouvre des pistes de recherche jusqu'alors inédites. La protéine Tau pourrait également se comporter comme une protéine prion ce qui expliquerait que la propagation dans le cerveau des dégénérescences neurofibrillaires soit bien corrélée avec le déclin cognitif au cours de la maladie (122).

5) Inflammation systémique

Les patients atteints de maladie d'Alzheimer développent fréquemment des syndromes confusionnels lorsqu'ils souffrent d'infections. Leurs troubles cognitifs sont alors aggravés de manière brutale et transitoire le temps de l'infection. A partir de cette constatation, de nombreuses équipes se sont intéressées à l'impact de l'inflammation systémique sur les fonctions cognitives. Dans une récente revue de la littérature Holmes expose les données actuelles sur l'impact de l'inflammation systémique sur le SNC (129). Bien que la BHE empêche le passage de la plupart des protéines, en particulier les cytokines pro-inflammatoires, l'inflammation systémique pourrait avoir un impact sur le SNC par différents mécanismes : 1) stimulation des nerfs périphériques comme le nerf vague relayé jusqu'à l'hypothalamus, 2) action directe du lipopolysaccharide (LPS), composant essentiel de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, et des cytokines pro-inflammatoires sur des zones de la BHE où la concentration de jonctions serrées est diminuée et sur les cellules endothéliales et les macrophages périvasculaires permettant une progression de l'inflammation à travers le parenchyme cérébral et 3) entrée directe de cellules immunitaires périphériques dans le parenchyme cérébral (281), ce recrutement pourrait se faire en particulier dans le cas de lésions cérébrales.

Dans une étude de cohorte de 1050 sujets, Schmidt *et al.* ont retrouvé qu'une augmentation de la « *C-reactive protein* » (CRP), marqueur non spécifique de l'inflammation systémique chez l'Homme, était associée à une augmentation de l'incidence de démence (maladie d'Alzheimer et démence vasculaire) de manière indépendante à la présence de facteurs de risque cardiovasculaires et ceci après 25 ans de suivi (271).

Holmes *et al.* ont étudié de manière prospective l'évolution des troubles cognitifs de 300 patients atteints de maladie d'Alzheimer durant 6 mois en fonction de la survenue d'un épisode infectieux dans les 2 mois précédents l'inclusion. Des dosages de la CRP et du TNF- α étaient également réalisés en début d'études. Leurs résultats montrent que la présence d'un

événement infectieux et un taux élevé de TNF- α étaient associés à une aggravation des troubles cognitifs à 6 mois (**figure 5**) (131). De plus, la présence de l'allèle ApoE4 pourrait augmenter la susceptibilité des patients atteints de maladie d'Alzheimer aux infections systémiques (301).

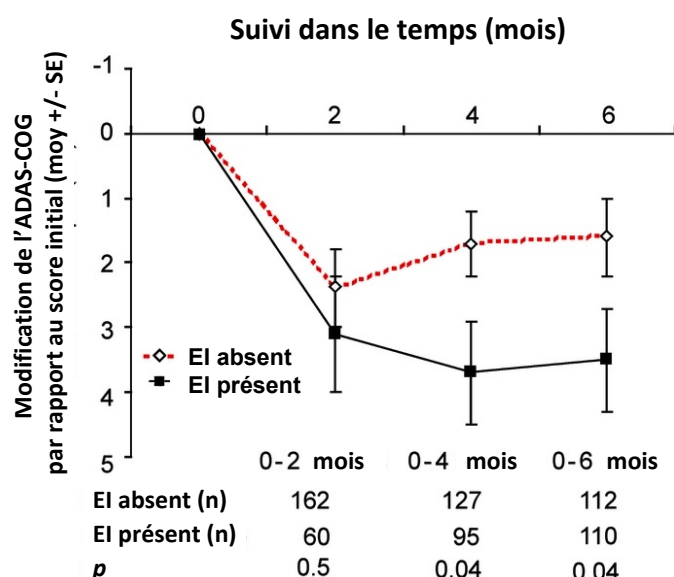


Figure 5. Inflammation systémique et déclin cognitif. Modification du score de l'ADAS-COG par rapport au score initial au cours du temps en fonction de la présence ou non d'événement infectieux. ADAS-COG (256), « *Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale* » score/70) ;EI, événement infectieux. D'après Holmes et al. (131)

L'impact de l'inflammation systémique a également été étudié dans des modèles murins. L'injection de LPS chez des souris Tg (APP-PS1 ou 3xTg-AD c'est-à-dire des souris capables de développer des plaques amyloïdes mais également une hyperphosphorylation des protéines Tau) provoque une accélération du dépôt de peptides A β (275), une augmentation de l'hyperphosphorylation des protéines Tau (151, 287) et une activation de la neuroinflammation (125). De plus, l'injection de LPS était associée d'une part à une majoration des troubles du comportement (activité sociale, motricité en particulier) chez les souris Tg par rapport aux souris WT et à une plus importante altération de la BHE chez les souris Tg par rapport aux souris WT (289). Des études sur des souris WT âgées montrent que l'injection périphérique de LPS induit une neuroinflammation plus importante que chez des souris jeunes (28).

Ces études confortent l'hypothèse selon laquelle la présence d'une inflammation systémique chronique augmenterait le risque de développer une démence. Mais on peut également se demander si la présence d'une inflammation systémique précéderait l'apparition de troubles cognitifs. En effet plusieurs études ont montré que les patients atteints de maladie d'Alzheimer avaient des marqueurs d'inflammation systémique plus élevés que les patients témoins (9, 32, 97, 290).

Les infections ou toute pathologie inflammatoire chronique en induisant une inflammation systémique et des anomalies vasculaires pourraient induire/majorer la neuroinflammation et l'altération de la BHE et ainsi participer à la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. A ce titre l'infection à *Helicobacter pylori* pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

2. *Helicobacter pylori*

Alors que l'hypothèse de la présence d'une bactérie causale de la maladie ulcéreuse avait été évoquée dès la fin du XIX^{ème} siècle par G. Bottcher et M. Letulle (150), ce n'est que 100 ans plus tard que deux médecins australiens, Robin Warren et Barry J. Marshall, ont isolé et réussi à cultiver pour la première fois *Helicobacter pylori* initialement nommé *Campylobacter pyloridis* puis *Campylobacter pylori*, et finalement reclassé dans un nouveau genre *Helicobacter*) à partir de biopsies gastriques (198). Raillés par la communauté scientifique qui ne croyait pas à l'hypothèse infectieuse des ulcères gastro-duodénaux, Marshall a confirmé un des postulats de Koch : il a ingéré une suspension de *H. pylori* qui a provoqué l'apparition d'une gastrite aiguë d'évolution favorable après traitement antibiotique. Cette découverte a permis à ces deux médecins-chercheurs d'être lauréats du Prix Nobel de physiologie et de médecine en 2005 soit 100 ans après le premier Prix Nobel attribué à Robert Koch pour la découverte d'un agent infectieux, *Mycobacterium tuberculosis* et son rôle dans la tuberculose. L'infection à *H. pylori* représente un bon modèle d'inflammation chronique : elle est acquise durant l'enfance et perdure toute la vie si elle n'est pas traitée. C'est la raison pour laquelle cette infection pourrait également participer à la physiopathologie de maladies extra digestives comme la maladie d'Alzheimer.

D. Généralités

1) Données épidémiologiques

La transmission de l'infection est inter-humaine par voie oro-orale (salive contaminée par des régurgitations ou des vomissements) principalement (44) dans les pays développés, alors qu'elle peut également se transmettre par voie fécale-orale du fait de la contamination de l'eau, *H. pylori* pouvant survivre en milieu aquatique (153).

Du fait de la fragilité de *H. pylori* en dehors de l'estomac, la transmission inter-humaine par la salive nécessite des contacts étroits et se produit essentiellement en intrafamilial ou dans les crèches (187). La prévalence de l'infection est donc directement liée aux conditions d'hygiène comme illustrée **figure 6**. La prévalence est d'environ 50% dans le monde mais varie de 20 à 80% en fonction des régions du monde.

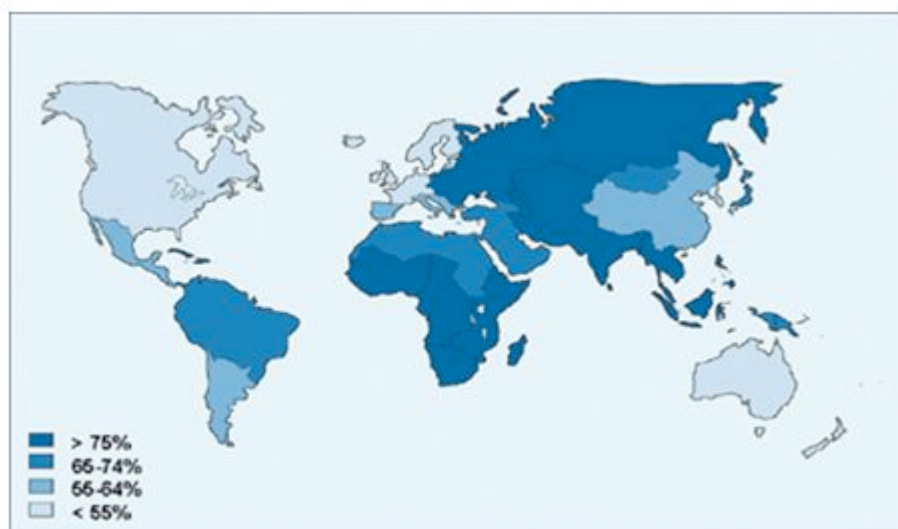


Figure 6. Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* dans le monde. D'après Leclerc *et al.* (165)

La diversité de prévalence dans l'espace mais également dans le temps est notée. En effet il existe un phénomène de cohorte en particulier dans les pays développés : la prévalence de l'infection est plus importante chez les sujets âgés que chez les sujets jeunes car ils ont vécu pendant leur enfance dans des conditions d'hygiènes plus précaires que les jeunes actuels (26). En France la prévalence de l'infection est d'environ 20% chez les sujets de moins de 50 ans et de 40% chez les plus de 50 ans. L'infection si elle n'est pas traitée perdure tout au long de la vie (285).

2) Caractéristiques bactériologiques

H. pylori est un bacille Gram-négatif spiralé ou incurvé, flagellé, vivant en microaérobiose, qui présente une affinité particulière pour l'épithélium de l'estomac. Biochimiquement, *H. pylori* peut être caractérisé par la présence de différentes enzymes telles que l'uréase, la catalase, la cytochrome oxydase, les phosphatases alcalines, et la gamma-glutamyl transpeptidase ainsi que l'absence de capacité à fermenter les sucres et à hydrolyser l'hippurate (206).

Sa survie et sa persistance dans le milieu gastrique reposent sur plusieurs facteurs résumés dans la **figure 7**, dont la résistance de la bactérie à l'environnement acide. Ceci est expliqué par plusieurs mécanismes. Le premier est la production d'uréase qui va transformer l'urée en ammoniac et en dioxyde carbone augmentant ainsi localement le pH gastrique (52, 208). Cette enzyme composée de 2 sous unités (UreA et UreB, cette dernière étant la partie active) est indispensable à la colonisation gastrique de *H. pylori*.

Ses *flagelles* unipolaires au nombre de 2 à 6 participent également à la colonisation gastrique de la bactérie car elles vont lui permettre de se mouvoir dans le mucus gastrique (226). Sa forme incurvée l'aide également à se déplacer au sein du mucus vers des zones où le pH est plus élevé par chimiotactisme (329). Ces flagelles ne sont pas reconnus par le Toll Like Receptor 5 (TLR 5) qui normalement, en présence de flagelles, active le système immunitaire inné (104). Cet échappement partiel au système immunitaire participe aussi à la colonisation gastrique de *H. pylori*.

L'expression d'*adhésines* comme BabA (« *Blood group Antigen-binding adhesin* ») ou SabA (« *Sialic acid-binding adhesin* ») permet à *H. pylori* d'adhérer aux antigènes Lewis présents sur la surface des cellules épithéliales gastriques (305).

De plus *H. pylori* est capable de déjouer les *réponses immunitaires innées et adaptatives*. En plus d'une diminution de détection par les TLR, *H. pylori* présente une résistance à la phagocytose (5) et peut induire l'apoptose des macrophages permettant une évvasion de la réponse immunitaire innée (47). L'infection à *H. pylori* est responsable d'une forte réponse humorale caractérisée par la production d'anticorps (237). *H. pylori* alors qu'il est un pathogène extracellulaire, induit une réponse immunitaire de type Th1 qui ne permet pas, de manière efficace, d'éradiquer l'infection (25).

Parmi tous les facteurs de virulence de *H. pylori*, deux sont particulièrement importants : VacA et l'îlot de pathogénécité (*cagPAI*) codant en particulier pour la protéine CagA (cytotoxin associated gene A). La toxine vacuolisante VacA est une protéine de 140 KDa capable

d'induire la formation de vacuoles dans certaines lignées cellulaires *in vitro*, d'activer des voies de signalisation cellulaires pro-inflammatoires et d'induire l'apoptose de cellules épithéliales. (98, 161). Elle pourrait également avoir une activité immunosuppressive (100). Le gène *vacA* est présent dans toutes les souches mais la protéine correspondante VacA n'est pas toujours exprimée. Cette différence de réponse est due à la présence de 3 régions variables du gène (20). Par ces différents mécanismes, la toxine VacA aide à la colonisation de *H. pylori* (260).

L'îlot de pathogénécité *cag* code pour un système de sécrétion de type IV et pour la protéine CagA. Cet îlot de pathogénécité a été acquis au cours de l'évolution par un transfert de gènes horizontal d'un microorganisme inconnu. Le système de sécrétion de type IV est composé d'un ensemble de protéines qui jouent le rôle de seringue capable d'injecter dans la cellule épithéliale un certain nombre d'effecteurs comme la protéine CagA. Celle-ci est capable d'induire un réarrangement du cytosquelette, de modifier les jonctions cellulaires et d'induire la sécrétion de cytokines proinflammatoires (22). Les souches CagA positives sont associées à des lésions inflammatoires de la muqueuse gastrique plus importantes que les souches CagA négatives ; elles sont également associées à une augmentation du risque de cancer gastrique ; ce qui a conduit à qualifier CagA d'oncoprotéine. Les souches CagA positives représentent plus de 90% des souches de *H. pylori* dans les pays asiatiques comme le Japon, la Chine ou la Corée où l'incidence des cancers gastriques est très élevée alors que sa prévalence n'est que de 60% dans les pays occidentaux où l'incidence du cancer est plus faible (229).

Principaux facteurs de colonisation et de virulence

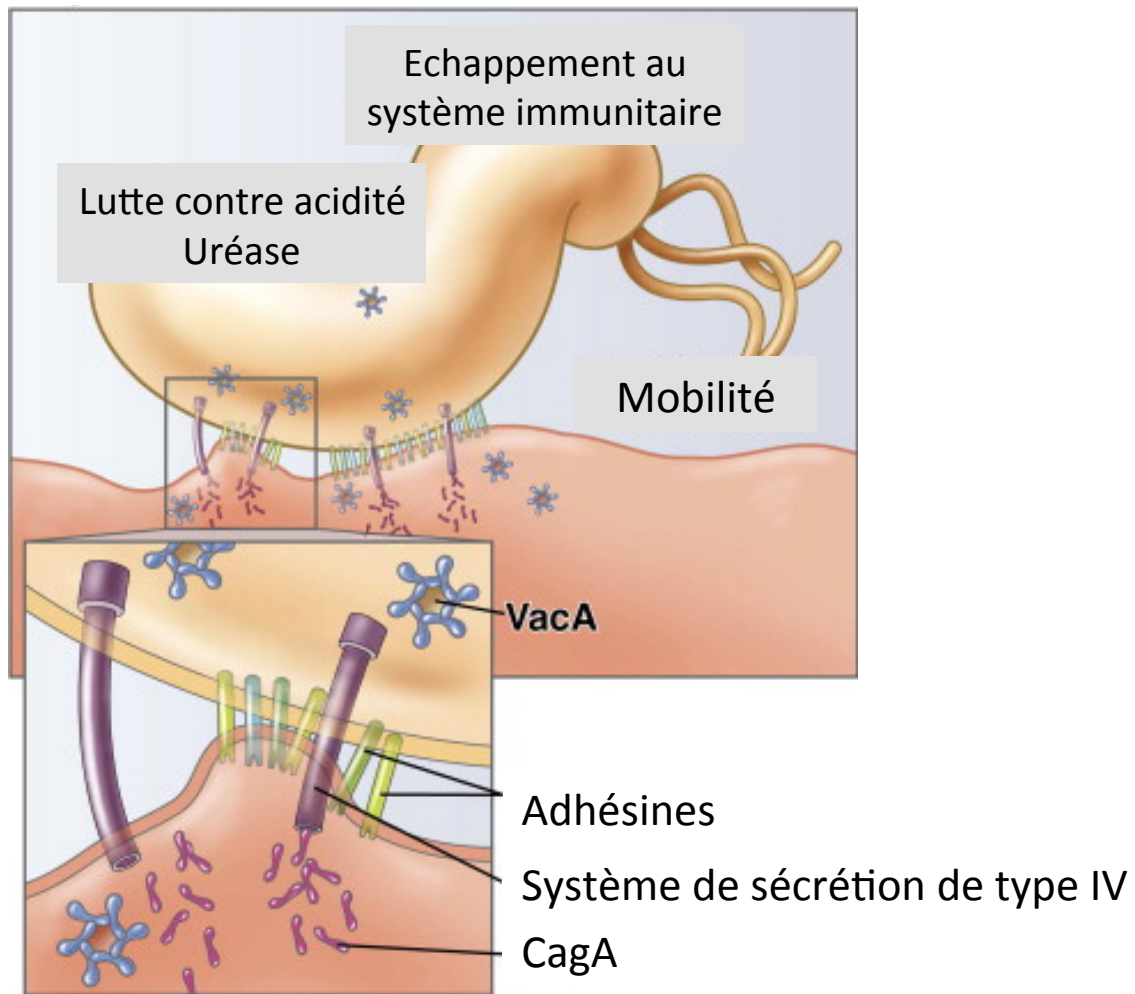


Figure 7. Principaux facteurs de colonisation et de virulence de *Helicobacter pylori*. D'après Amieva *et al.* (13)

Cette adaptation de *H. pylori* à l'environnement gastrique et sa capacité à coloniser la muqueuse gastrique lui permettent de persister pendant des décennies tout en étant à l'origine d'une inflammation gastrique aux conséquences pathologiques importantes.

3) *Helicobacter pylori* et pathologies gastriques

Les différentes conséquences cliniques de l'infection à *H. pylori* sont résumées dans la **figure 8** (154). L'infection à *H. pylori* induit toujours une inflammation au niveau de la muqueuse gastrique qu'on appelle une *gastrite*. Cette inflammation persiste toute la vie si l'infection n'est pas traitée. Elle n'est pas associée à des anomalies morphologiques visibles macroscopiquement lors de l'endoscopie, en revanche l'examen histologique retrouve une

réaction inflammatoire avec la présence de polynucléaires neutrophiles dans la zone où la bactérie est présente, ainsi qu'une réaction lymphoplasmocytaire au niveau du chorion. Cette réaction inflammatoire est également associée à la production de cytokines pro-inflammatoires locales (54, 174, 217, 222) voire systémiques (238, 258).

Dans environ 85% des cas la gastrite induite par *H. pylori* reste asymptomatique. Dans moins d'1% des cas, cette gastrite peut se compliquer d'un *lymphome gastrique du MALT* (mucosa-associated lymphoid tissue). Ce lymphome est une forme rare de lymphome non Hodgkinien. Une prolifération lymphoïde B monoclonale se développe aux dépens du tissu lymphoïde associé aux muqueuses, en particulier de l'estomac où l'infection à *H. pylori* a induit la formation de follicules lymphoïdes réactionnels. Dans 80% des cas, un traitement de l'infection à *H. pylori* par antibiotique suffit pour aboutir à une guérison du lymphome (29) ; dans les autres cas, une chimiothérapie est nécessaire en particulier lorsque des adénopathies sont associées ou qu'il existe des anomalies génétiques de la population lymphocytaire B monoclonale (176). Dans 5 à 10% des cas, l'infection à *H. pylori* évolue vers un ulcère gastrique ou duodéal. Enfin si la gastrite est associée à une *atrophie*, caractérisée par une réduction de la hauteur des cryptes gastriques ou de la quantité de glandes gastriques, elle peut évoluer vers une *métaplasie intestinale* (remplacement de cellules épithéliales gastriques par des cellules de type intestinal), une *dysplasie gastrique* voire un *adénocarcinome gastrique de type intestinal*. Cette cascade d'événements a été décrite par Correa en 1975 avant la découverte de *H. pylori* (53). On estime qu'un patient sur cent infecté développera, après plusieurs dizaines d'années d'infection, un cancer gastrique (162). Les premières études utilisant la sérologie *H. pylori* indiquaient une prévalence de l'infection de 80% parmi les malades atteints d'un cancer gastrique. Des études plus récentes utilisant d'autres sérologies recherchant en particulier la présence d'anticorps anti-CagA, ont montré que la prévalence était en fait beaucoup plus élevée : 93% en Europe et 98% au Japon. Une étude chinoise prospective, randomisée, contre placebo portant sur 1630 patients infectés par *H. pylori* habitant la province de Fujian, à forte incidence de cancer gastrique, ont été suivis pendant 7,5 ans. Les auteurs n'ont pas retrouvé de diminution significative de l'incidence du cancer gastrique entre les patients traités pour l'infection et le groupe placebo. En revanche, parmi les 988 patients qui n'avaient pas de lésion pré-néoplasique à l'inclusion, aucun cancer n'est survenu chez les 485 sujets ayant eu une éradication de *H. pylori* contre six cancers parmi les 503 patients ayant reçu le placebo, cette réduction du risque de cancer était statistiquement

significative (323). *Helicobacter pylori* est classé selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme un pathogène carcinogène de classe I pour le cancer gastrique depuis 1994 (3).

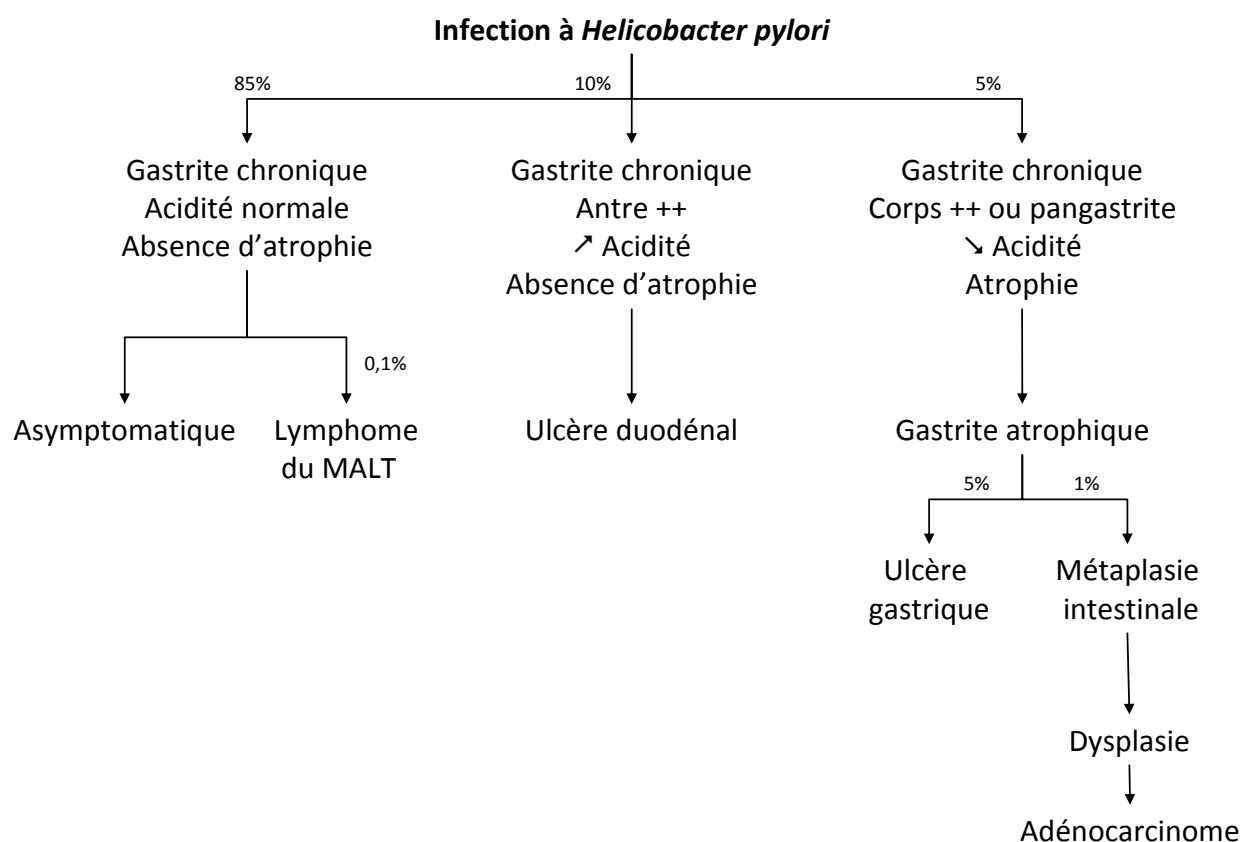


Figure 8. Pathologies gastro-duodénales induites par l'infection à *Helicobacter pylori*. D'après Konturek et al. (154)

4) Méthodes diagnostiques

Il existe différentes méthodes pour établir le diagnostic d'infection à *H. pylori*.

La méthode la plus utilisée en France est l'*histologie* réalisées à partir de 2 biopsies antrales et 2 biopsies fundiques (système de Sydney) effectuées au cours d'une endoscopie oeso-gastro-duodénale (67). *H. pylori* peut être visualisé après coloration à l'hématoxyline éosine safran (HES) ou de Giemsa. Les biopsies peuvent également être mises en *culture*, après dilacération par broyeur manuel, sur des milieux enrichis en sang et rendus sélectifs par l'ajout d'antibiotiques inhibant la croissance des bacilles Gram négatif (acide nalidixique, polymyxine), des cocci Gram positif (vancomycine) et les levures (amphotéricine B) pour éliminer la flore de la cavité buccale ou d'un reflux duodénal (206). Les géloses ensemencées sont alors placées en atmosphère microaérobie. La présence d'uréase, oxydase et catalase et une coloration de Gram permet de détecter la présence de *H. pylori*. La culture permet

également de tester la sensibilité de la souche à différents antibiotiques. La nécessité de conditions de transport rigoureuses (envoi réfrigéré dans les 24 heures) limite l'utilisation de cette méthode qui pourtant devient indispensable en cas d'échec thérapeutique.

La méthode de détection par *PCR* permet également d'identifier la présence éventuelle de gènes de résistance à la clarithromycine ou aux fluoroquinolones ou de gènes de facteurs de virulence comme *cagA* ou *vacA* (45).

Deux autres méthodes non invasives permettent également de diagnostiquer une infection à *H. pylori*. Tout d'abord, le test respiratoire à l'urée marquée au carbone 13 utilise l'uréase abondante produite par *H. pylori*. A jeun, le patient boit une solution d'urée marquée au ^{13}C , celle-ci est hydrolysée en $^{13}\text{CO}_2$ et NH_3 si le patient est infecté par *H. pylori*, le $^{13}\text{CO}_2$ est éliminé dans le sang puis dans l'air expiré. L'utilisation d'un spectromètre de masse permet de déterminer le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ et donne une évaluation semi quantitative de la charge bactérienne. Cet examen a une bonne sensibilité, et est utilisé pour confirmer l'efficacité du traitement curatif de l'infection à *H. pylori*. La sérologie permet également de faire le diagnostic de manière non invasive. La détection d'immunoglobulines (Ig) G se fait par méthode ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay »). Une récente étude a permis de mettre en avant les trousse commercialisées en France dont la fiabilité (capacité du test à classer correctement le patient en infecté ou non) était proche de 95% par rapport à la culture et l'histologie (43). Certains anticorps comme celui dirigé contre une protéine de virulence CagA peuvent persister pendant plusieurs années dans le sérum (180, 318) ce qui en fait un bon outil pour faire également un diagnostic *a posteriori*. Alors que le test respiratoire à l'urée marquée peut être faussement négatif dans le cas de prise d'antibiotiques et d'inhibiteurs de la pompe à protons (IPP), ou faussement positif dans le cadre d'hémorragie digestive, la réalisation d'une sérologie peut être une bonne alternative.

Chez le sujet âgé, la prise d'inhibiteur d'IPP, l'utilisation répétée d'antibiotiques et la fréquence de l'atrophie gastrique rendent le diagnostic d'infection à *H. pylori* difficile. Salles *et al.* (262) ont montré que le test respiratoire à l'urée marquée était très utile dans cette population.

Il est également possible de rechercher la présence d'antigène de *H. pylori* dans les selles par technique ELISA.

Au total, les méthodes standard invasives en particulier bactériologiques permettent de déterminer le profil de résistance de *H. pylori* mais peuvent être faussement négatives

(hétérogénéité de distribution de *H. pylori* dans la muqueuse gastrique, atrophie et prise d'IPP), alors que les méthodes non invasives permettent de réaliser des contrôles post traitement (test respiratoire) et ne sont pas influencées par la prise d'IPP ou l'atrophie gastrique (sérologie).

5) Traitement de l'infection à *Helicobacter pylori*

Une conférence de consensus datant de 1999 préconisait comme traitement de première intention de l'infection à *H. pylori* l'utilisation d'une association d'un IPP, et de deux antibiotiques : clarithromycine et amoxicilline (ou de métronidazole chez les patients allergiques aux β -lactamines) pendant 7 jours (1, 189). Une étude européenne a montré en 2013 l'augmentation importante de la résistance à la clarithromycine (>20%) et au métronidazole (60%), en particulier en France et dans le sud de l'Europe en faveur d'une modification des recommandations de traitement d'éradication de *H. pylori* (207, 339). Deux stratégies sont actuellement recommandées, la première est une thérapie séquentielle qui consiste à donner pendant 5 jours de l'amoxicilline et un IPP, puis de poursuivre l'IPP associé pendant 5 jours à la prise de clarithromycine et de métronidazole (303). La deuxième stratégie est la prise concomitante d'une quadrithérapie à base de bismuth, tétracycline, métronidazole et IPP (188).

E. *Helicobacter pylori* et les pathologies extra gastriques

Du fait de la durée de l'infection par *H. pylori* et du modèle d'inflammation chronique qu'elle représente, son rôle dans le développement et la progression de pathologies extra-digestives a été rapporté dans de nombreuses études (94). Les hypothèses de mécanismes sous jacents incluent 1) l'induction d'une *inflammation chronique et sa persistante* locale et systémique, 2) l'induction d'un *mimétisme moléculaire*, c'est-à-dire la production d'anticorps dirigés contre des protéines de *H. pylori* capables de reconnaître des antigènes de l'hôte (auto-immunité) et enfin 3) la modification de l'absorption de certains nutriments comme la vitamine B12.

Chaque année, « the European *Helicobacter Study Group* » publie une revue des articles consacrés à l'association de l'infection à *H. pylori* et des pathologies extra-digestives. En 2013, j'ai pu participer au travail de rédaction de cet article (257) (**Annexe 1**). Les principales

pathologies extra-digestives concernées sont les pathologies cardiovasculaires, hématologiques et neurodégénératives.

1) Les pathologies cardiovasculaires

La cardiopathie ischémique est la première pathologie extra-digestive dont l'association avec *H. pylori* a été étudiée. En 1994, Mendal *et al.* évoquent pour la première fois une association entre ces deux pathologies dans une étude cas-témoins. Parmi les 111 patients suivis pour une cardiopathie ischémique, 59% avaient une sérologie *H. pylori* positive, alors que seulement 39% des 74 témoins étaient infectés. L'association était significative (odds ratio (OR) 2,15, $p = 0,03$) après un ajustement pour l'âge, les facteurs de risque cardiovasculaire et le niveau social (209). A partir de cette première publication, de nombreux travaux, en particulier d'autres études cas-témoins concernant des milliers de patients, ont retrouvé des résultats contradictoires, certains en faveur d'une association (60, 143, 160, 235, 242) et d'autres ne retrouvant pas d'association (88, 119, 248, 249, 250, 284, 316, 320). L'association pourrait être d'autant plus importante que la souche bactérienne est virulente comme évoquée pour la première fois par Pasceri *et al.* (230). Ces mêmes auteurs ont réalisé une méta-analyse 8 ans plus tard sur 10 études rétrospectives cas-témoins (1527 cas et 1661 témoins) et 3 études prospectives de cohorte (701 cas et 1439 témoins) et ont retrouvé une association entre les souches CagA positives et les cardiopathies ischémiques que ce soit dans les études cas témoins (OR 1,87, 95% CI 1,46-2,40) ou dans les études de cohorte (OR 1,26, 95% CI 1,05-1,51). Les auteurs n'ont en revanche pas retrouvé d'association lorsque les patients étaient infectés par des souches CagA négatives (231). Une autre méta-analyse confirme cette association sur plus de 4000 patients (93). Les mécanismes qui peuvent expliquer une telle association ont été étudiés (80, 194). Certains auteurs ont retrouvé la présence d'ADN de *H. pylori* dans la plaque athéromateuse et ont évoqué la possibilité d'un effet direct de la bactérie sur la progression et l'instabilité de la plaque athéromateuse (12, 84, 147, 159). Toutefois ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres études (36, 144, 192). *H. pylori* pourrait également directement altérer la paroi endothéliale et entraîner une dysfonction endothéliale (migration, prolifération, fonction de barrière) (142, 145, 225, 234, 294)

L'infection à *H. pylori* pourrait aussi induire une augmentation des facteurs de risque cardiovasculaires comme l'hyperlipidémie (146, 220, 266) ou l'hypertension artérielle (211, 302). L'inflammation induite par *H. pylori* pourrait majorer l'hypercoagulabilité des patients en augmentant le taux de fibrinogène et d'autres marqueurs de l'inflammation (258, 146, 232, 299) mais ces résultats sont sujets à controverse (60, 177, 182, 278). Stone *et al.* ont étudié l'évolution de 325 patients au décours d'un syndrome coronarien aigu répartis en 3 groupes (placebo, traitement de l'infection à *H. pylori* ou traitement de l'infection à *C. pneumoniae*) et suivis pendant 1 an. Le syndrome inflammatoire (CRP et fibrinogène plasmatiques) était diminué dans les groupes traités ($p=0,06$). A 3 mois l'incidence de mort subite ou de récurrence ischémique était diminuée dans les groupes traités par rapport au groupe placebo indépendamment du statut infectieux. Ces résultats soulèvent l'hypothèse que les antibiotiques pourraient avoir un rôle anti inflammatoire, ou bien que les modifications de la flore bactérienne intestinale qu'ils induisent pourraient jouer un rôle sur les pathologies cardiovasculaires (283).

L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque cardiovasculaire et l'atrophie gastrique induite par *H. pylori* pourrait la majorer (148, 196, 236). En effet l'atrophie gastrique entraîne une malabsorption de la vitamine B12 et la carence en vitamine B12 est associée à l'hyperhomocystéinémie (la vitamine B12 est un cofacteur indispensable de la méthionine synthase dans le cycle de reméthylation qui permet de produire de la méthionine à partir de l'homocystéine). Mais d'autres études ne retrouvent pas de lien entre *H. pylori* et le taux d'homocystéine plasmatique (267, 321).

L'association entre l'infection à *H. pylori* et les AVC ischémiques a également été étudiée (48, 49, 56, 63, 127, 319). Alors que Chen *et al.* (49) retrouvent un caractère protecteur de l'infection vis-à-vis de la survenue d'AVC ischémique, la méta-analyse de Pasceri *et al.* décrite plus haut, concernant 4 études cas-témoins rétrospectives (153 cas et 590 témoins) retrouvait une association significative entre le statut CagA et les AVC ischémiques (OR 2,43, 95% CI 1,89-3,13) (231), une autre méta-analyse confirme ces résultats (56). Cette association concernerait particulièrement les AVC touchant les petits vaisseaux (127).

2) Les pathologies hématologiques

a. Anémie par carence martiale idiopathique.

Marignani *et al.* sont les premiers à avoir décrit que la correction d'une anémie par carence martiale sans étiologie retrouvée malgré des explorations en particulier digestives, s'était révélée possible par un traitement d'éradication de *H. pylori* (195). Depuis, de nombreuses études ont exploré cette association (16, 59, 233). Une méta-analyse incluant 16 études contrôlées randomisées représentant 956 patients infectés par *H. pylori*, montre que les taux d'hémoglobine et de fer étaient significativement plus élevés dans le groupe des patients traités par antibiotiques et fer, que dans le groupe de patients uniquement traités par du fer (330). Une autre méta-analyse confirme ces résultats (133). Les mécanismes qui peuvent expliquer cette carence en fer sont les suivants : *H. pylori* absorbe le fer pour sa croissance (166), réduit l'acide ascorbique dans l'estomac nécessaire pour l'absorption du fer (15) et induit une perte en fer par des microérosions gastriques (92).

b. Purpura thrombopénique immunologique

Le purpura thrombopénique immunologique (PTI) est caractérisé par une diminution isolée des plaquettes (plaquettes $< 150 \times 10^9/L$) du fait de leur destruction par la production d'auto-anticorps antiplaquettes (2). Parmi les étiologies à rechercher, on retrouve les causes virales (hépatites B et C, VIH), médicamenteuses et certaines maladies auto-immunes comme le lupus.

La prévalence de l'infection chez les patients qui ont un PTI n'est pas différente de celle de la population générale. En 1998, Gasbarrini *et al.* ont montré que l'éradication efficace de l'infection chez 11 patients infectés thrombopéniques avait permis l'augmentation des plaquettes (99). A partir de cette publication, de nombreuses autres études ont retrouvé des résultats comparables (78, 79, 115, 296, 300, 308, 309, 311, 312). Cependant certaines études n'ont pas confirmé ces résultats (140, 210)

Une méta-analyse a montré que sur 788 patients (16 études observationnelles et 1 étude randomisée), une augmentation significative des plaquettes était notée chez les patients infectés dont le traitement d'éradication avait été efficace par rapport aux patients non traités ou à ceux pour qui le traitement anti-infectieux n'avait pas été efficace ou aux patients non infectés (95). D'autres essais randomisés seraient encore nécessaires mais vu le prix et la bonne tolérance du traitement de l'infection à *H. pylori*, il est maintenant recommandé de

rechercher et de traiter une infection à *H. pylori* en cas de PTI (108). Le mécanisme sous jacent serait expliqué par un mimétisme moléculaire (288), en particulier, les anticorps anti-CagA interagiraient avec des antigènes présents sur les plaquettes (91). Le terrain génétique du patient pourrait également moduler l'effet de *H. pylori* (308, 310).

Le rôle de l'infection à *H. pylori* dans d'autres pathologies hématologiques (pics monoclonaux de signification indéterminée (191, 280)), ORL (cancer (109)), respiratoire (effet protecteur sur l'asthme (335)), ophtalmologique (glaucome (332)), endocrinologique (thyroïdite (276)) colique (cancer (190)), hépato-biliaire (334, 336), etc, reste controversé (94).

En ce qui concerne les pathologies neurologiques, une association avec l'infection à *H. pylori* a été recherchée pour l'épilepsie (19), la sclérose en plaque (158, 179, 328) et la maladie de Parkinson (68, 219).

Comme nous l'avons vu la maladie d'Alzheimer semble d'origine multifactorielle. L'inflammation et les facteurs de risque vasculaires influencent l'incidence et la progression de cette maladie neurodégénérative. C'est à partir de ces données là que l'association entre l'infection à *H. pylori* et la maladie d'Alzheimer a été évoquée.

F. *Helicobacter pylori* et la maladie d'Alzheimer

1) Etudes cas –témoins

Deux études cas-témoins montrent une prévalence augmentée de l'infection chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer. Malaguarnera *et al.* ont comparé les taux d'anticorps anti-*H. pylori*, de CRP, de vitamine B12 et d'homocystéine sériques chez 30 patients atteints de maladie d'Alzheimer, 30 patients atteints de démence vasculaire et 30 patients témoins. Les trois populations étaient comparables pour l'âge, le niveau d'éducation, les statuts nutritionnels et socio-économiques. Le taux d'anticorps anti-*H. pylori* était plus important chez les patients atteints de démence vasculaire par rapport aux 2 autres groupes et les patients atteints de maladie d'Alzheimer avaient un taux d'anticorps plus importants que les patients témoins. Les taux de CRP et d'homocystéine sériques étaient plus élevés chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer et de démence vasculaire par rapport aux témoins (186).

Kountouras *et al.* ont confirmé l'association entre l'infection à *H. pylori* et la maladie d'Alzheimer dans une autre étude cas-témoins. A la différence de la précédente étude les auteurs ont utilisé différentes méthodes diagnostiques de l'infection à *H. pylori* : sérologie, test respiratoire à l'urée marquée et histologie à partir de biopsies gastriques réalisées au cours d'une endoscopie. Ils ont comparé 50 patients atteints de maladie d'Alzheimer et 30 patients témoins qui présentaient une anémie mais dont l'endoscopie était normale. Les auteurs n'ont pas précisé pour quelle raison les patients atteints de maladie d'Alzheimer avaient bénéficié d'une endoscopie. Ils ont également comparé le taux d'homocystéine sérique entre ces deux groupes. Les patients atteints de maladie d'Alzheimer étaient significativement plus âgés, en revanche le niveau socio-économique des deux groupes était comparable. L'examen histologique retrouvait une prévalence de l'infection, un taux d'anticorps anti-*H. pylori* et d'homocystéine significativement plus importants chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer par rapport aux témoins. En revanche, si on tenait compte des résultats qualitatifs du test respiratoire et de la sérologie, la prévalence de l'infection était comparable dans les 2 groupes (157).

Dans une étude cas-témoins japonaise de prévalence (385 patients atteints de maladie d'Alzheimer et 97 témoins), les résultats montrent que les patients déments étaient plus âgés et plus souvent des hommes. La prévalence de l'infection reposait sur la sérologie et n'était pas significativement différente entre les 2 groupes. (62% *versus* 60%, $p = 0,67$) (277).

Ces premières études cas-témoins ont permis de mettre en valeur une possible association entre l'infection à *H. pylori* et la maladie d'Alzheimer, même si elles portent sur peu de patients.

2) Etudes de cohorte

En 2013, Beydoun *et al.* ont utilisé les données d'une cohorte nationale américaine suivie entre 1988 et 1991 ($n=4213$), en particulier des tests neuropsychologiques et le statut sérologique vis à vis de *H. pylori*. Il y avait 2 groupes d'âge différents : les sujets jeunes (20-59 ans, $n=2090$) et les sujets âgés (60-90 ans, $n = 2123$). Ils ont montré que les sujets âgés infectés avaient de moins bonnes performances cognitives par rapport aux autres groupes (34).

La même année, Katan *et al.* ont étudié l'association de plusieurs sérologies (*C. pneumoniae*, *H. pylori*, cytomegalovirus, et HSV 1 et 2) sur un échantillon de 1625 patients de la « *Northern Manhattan Study* » (NOMAS, n=3298) inclus entre 1993 et 2001. La positivité de ces sérologies (présentée sous la forme d'un index) était associée à une moins bonne performance cognitive même après ajustement (âge, sexe, ethnie, niveau d'éducation, facteurs de risque cardiovasculaires et dépression). En revanche, il n'a pas été retrouvé d'association entre le statut infectieux et le déclin cognitif dans le temps (149). Sur cette même population Elkind *et al.* avaient montré que ces infections étaient associées à la survenue d'AVC et d'athérosclérose carotidienne (75, 76).

En 2014, Huang *et al.* se sont intéressés à l'association de l'infection à *H. pylori* avec les démences en utilisant les données d'une cohorte nationale chinoise. Ils ont distingué 2 groupes de patients de 40 ans suivis entre 1998 et 2010 en fonction de leur statut infectieux (ratio 1 sur 4). Les deux groupes étaient comparables pour l'âge (63 ans environ), le sexe (60% d'hommes), en revanche les patients infectés présentaient plus fréquemment une HTA, un diabète, des antécédents de traumatisme crânien et un syndrome dépressif ($p < 0,0001$). En comparaison au groupe non infecté (n=67172), les patients infectés par *H. pylori* (n=16793) avaient un risque de développer une démence non-Alzheimer multiplié par 1,6 après ajustement aux comorbidités sus citées alors que les auteurs n'ont pas retrouvé d'association entre l'infection et la maladie d'Alzheimer. Etonnamment, le risque de démence augmentait avec le nombre d'épisodes infectieux (132).

Ces études de cohortes concernent un grand nombre de patients mais les niveaux d'éducation et socio-économiques n'ont pas toujours été pris en compte ce qui peut représenter des facteurs confondants entre les 2 pathologies.

3) Etudes d'intervention

Après avoir retrouvé une prévalence augmentée de l'infection chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer par rapport à des patients témoins, Kountouras *et al.* ont étudié le déclin cognitif de manière prospective chez des patients atteints de maladie d'Alzheimer infectés par *H. pylori* ; 3 groupes ont été constitués, le premier groupe comprenait les patients ayant reçu un traitement d'éradication (n=28) (omeprazole, clarithromycine et amoxicilline), avec succès, le deuxième, les patients qui avaient refusé le traitement ou pour qui le traitement n'avait pas

été efficace (n=28) et enfin un troisième groupe de patients atteints sans infection à *H. pylori* (n=5). Tous les patients avaient le même traitement anticholinestérasique. Trois tests cognitifs ont été utilisés : le MMSE (« *Mini Mental State Examination* »), le CAMCOG (« *Cambridge Cognitive Examination for the Elderly* ») et le FRSSD (« *Functional Rating Scale for Symptoms of Dementia* »). Après 2 ans de suivi, les tests cognitifs se sont améliorés dans le groupe traité avec succès, à la différence des 2 autres groupes (156).

Un an plus tard les mêmes auteurs ont étudié l'impact du traitement d'éradication de l'infection à *H. pylori* sur la mortalité dans les trois groupes de patients décrits précédemment. Après un suivi de 5 ans, le traitement d'éradication était associé à une meilleure survie après ajustement sur l'âge, le sexe et le MMSE. [Hazard Ratio (intervalle de confiance 95%) = 0,287 (0,114-0,725), p = 0,008] (155). Bien que ces 2 études ne comprennent que peu de patients et que les groupes étudiés soient hétérogènes, ces résultats préliminaires sont originaux et mériteraient d'être complétés par une étude randomisée contre placebo.

A noter que deux études réalisées sur 600 patients et 10000 patients n'ont pas retrouvé d'impact de l'infection à *H. pylori* sur la mortalité, toutes causes confondues (49, 261).

Par ailleurs, Chang *et al.* ont utilisé les données de l'assurance maladie de Taiwan et ont inclus, entre 2001 et 2008, 1538 patients atteints de maladie d'Alzheimer avec un ulcère gastrique. Ils ont étudié l'association entre l'éradication de l'infection à *H. pylori* et la progression de la maladie. Ils ont considéré qu'il y avait une progression de la maladie quand le traitement anticholinestérasique était modifié (arrêt du donepezil ou rivastigmine ou galantamine pour la mémantine). Parmi les 1538 patients, 675 ont été traités et 863 n'ont pas reçu le traitement d'éradication de *H. pylori*. La prévalence du diabète, de l'HTA, des AVC, et des cardiopathies était moins élevée chez les patients qui avaient été traités. Le traitement d'éradication de *H. pylori* était associé à un risque diminué de progression (OR 0,35 [0,23-0,52]) par rapport au groupe non traité. Cette étude concerne un grand nombre de patients, on peut toutefois regretter que la définition de la progression de la maladie d'Alzheimer ne repose que sur une modification thérapeutique et non sur l'évolution de tests cognitifs. De même, la présence d'un ulcère gastrique ne signe pas la présence d'une infection à *H. pylori* et on peut se demander si l'absence de traitement d'éradication n'était pas due à l'absence d'infection (46).

Ces études montrent un certain nombre de résultats en faveur d'une association entre l'infection à *H. pylori* et la maladie d'Alzheimer qui reposent principalement sur des mécanismes vasculaires avec l'hyperhomocystéinémie induite par l'atrophie gastrique (273) et l'inflammation chronique qui sont des facteurs de risque de développer une maladie d'Alzheimer (**tableau 3**).

La maladie d'Alzheimer est une maladie polyfactorielle et l'étude des facteurs pouvant l'induire ou l'aggraver est nécessaire. C'est la raison pour laquelle, à partir de ces premiers résultats nous avons voulu poursuivre les travaux basés sur l'hypothèse d'un impact possible de l'infection à *H. pylori* sur la maladie d'Alzheimer.

Tableau 3. Principaux résultats des études concernant l'association entre l'infection à *Helicobacter pylori* et la maladie d'Alzheimer.

	Type d'étude	Nombre patients	Principaux résultats	Principaux résultats			
				MA	DVAsc	Témoins	
Malaguenera <i>et al.</i> (186)	Cas-témoins (Italie)	n=90	IgG anti- <i>H. pylori</i> (UI/mL)	25	21	14	*
			CRP (mg/L)	9	10	1	*
			Hcy	26	24	11	*
Kountouras <i>et al.</i> (157)	Cas-témoins (Grèce)	n=60	IgG anti- <i>H. pylori</i>	34	17	NR	*
			Test respiratoire	30 (60%)	NR	14 (47%)	NS
			Histologie positive	44 (88%)	NR	14 (47%)	*
			Hcy (umol/L)	18	NR	14	*
Shiota <i>et al.</i> (277)	Cas-témoins (Japon)	n=482	Sérologie positive	62%		60%	NS
Beydoun <i>et al.</i> (34)	Cohorte (Etats Unis)	n=4213	L'infection était associée à de moins bonnes performances cognitives				*
Katan <i>et al.</i> (149)	Cohorte (Etats Unis)	n=1625	Un ensemble d'infection dont <i>H. pylori</i> est associé à de moins bonnes performances cognitives à l'inclusion sans effet sur le déclin cognitif				*&
Huang <i>et al.</i> (132)	Cohorte (Chine)	n=83965	L'infection est un facteur de risque de développer une démence non MA				*&
Kountouras <i>et al.</i> (156)	Observation intervention (Grèce)	n=61	Le traitement de l'infection est associé à une amélioration cognitive				*
Chang <i>et al.</i> (46)	Observation intervention (Taiwan)	n=1538	Le traitement de l'infection est associé à une moindre progression de la maladie				*

DVasc, démence vasculaire ; Hcy, homocystéine ; IgG, immunoglobuline G, MA, maladie d'Alzheimer ; NR, non renseigné ; * significatif ; & un ajustement a été réalisé.

II. L'INFECTION A *HELICOBACTER PYLORI* EST-ELLE ASSOCIEE A UNE AUGMENTATION DE L'INCIDENCE DES DEMENCES ?

Article 1. Roubaud Baudron C, Letenneur L, Langlais A, Buissonnière A, Mégraud F, Dartigues JF, Salles N; Personnes Agées QUID Study. Does *Helicobacter pylori* infection increase incidence of dementia? The Personnes Agées QUID Study. J Am Geriatr Soc. 2013 Jan;61(1):74-8.

Cet article a bénéficié d'un *editorial* par le Professeur Joe Verghese, neurologue à *Albert Einstein College of Medicine* à New York (Verghese J Slaying dementia dragons with blood, lungs, and guts. J Am Geriatr Soc. 2013 Jan;61(1):155-7)

Dans ce premier travail, nous avons travaillé en collaboration avec Jean-François Dartigues et Luc Letenneur (INSERM U897, Institut de Santé Publique, d'Épidémiologie et de Développement (ISPED), Université de Bordeaux) sur les données de la cohorte PAQUID (Personnes Agées, quid). L'étude PAQUID est une étude épidémiologique française du vieillissement cérébral. Un des objectifs de cette étude était d'estimer la prévalence et l'incidence des démences et en particulier la maladie d'Alzheimer et d'identifier des facteurs de risque du déclin cognitif. Un échantillon de 3777 sujets âgés de 65 ans et plus, vivant à leur domicile, a été tiré au hasard sur les listes électorales de Gironde et Dordogne et a accepté d'être suivi. Le recueil des données a débuté en 1988 en Gironde et en 1989 en Dordogne. Tous les sujets ont été visités à domicile par des psychologues spécifiquement formés. Les principaux éléments recueillis concernaient les données sociodémographiques, les conditions de vie et les médicaments. L'autonomie était évaluée et une batterie de tests neuropsychologiques était réalisée, incluant le Mini-Mental Status (MMS) de Folstein (89) (**Annexe 2**) pour évaluer le fonctionnement cognitif global. Les sujets chez lesquels la psychologue suspectait un diagnostic de démence étaient revus par un neurologue qui faisait un examen clinique et des examens complémentaires pour confirmer le diagnostic. Tous les sujets ont ensuite été suivis de la même façon environ tous les deux ans depuis la visite initiale. Nous avons pu bénéficier pour notre étude des données recueillies à 20 ans.

Parmi les 3777 sujets âgés inclus, un sous groupe de patients a accepté d'avoir un prélèvement sanguin ce qui nous a permis rétrospectivement de réaliser une sérologie *H. pylori*. A l'inclusion, nous avons retrouvé que la prévalence des démences était plus importante chez les patients infectés par *H. pylori*. De plus les patients infectés avaient de moins bonnes performances cognitives. Après 20 ans de suivi, l'infection à *H. pylori* était associée à une augmentation de l'incidence de démence après ajustement aux facteurs de risque connus de maladie d'Alzheimer.

Does *Helicobacter pylori* Infection Increase Incidence of Dementia? The Personnes Agées QUID Study

Claire Roubaud Baudron, MD, MSc,^{*†‡} Luc Letenneur, PhD,^{†‡} Anthony Langlais, MSc,^{†§} Alice Buissonnière,^{*†} Francis Mégraud, MD, PhD,^{*†} Jean-François Dartigues, MD, PhD,^{†§} and Nathalie Salles, MD, PhD,^{*†‡} for the Personnes Agées QUID Study

[Editorial Comments by Dr. Joe Verghese, pp 155–157]

OBJECTIVES: To determine whether *Helicobacter pylori* infection was associated with dementia and risk of developing dementia in a longitudinal population-based cohort of elderly adults living in the community.

DESIGN: Prospective community-based cohort study.

SETTING: The population-based Personnes Agées QUID (PAQUID) Study.

PARTICIPANTS: Six hundred three noninstitutionalized individuals aged 65 and older living in the southwest of France followed from 1989 to 2008.

MEASUREMENTS: A descriptive and comparative analysis including dementia prevalence, according to *H. pylori* status (serology), was made at baseline. Cox proportional hazard models were used to study the risk of developing dementia according to *H. pylori* status assessed on sera samples from elderly adults initially free of dementia and followed for 20 years. A neurologist diagnosed dementia according to *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Third Edition* criteria.

RESULTS: At baseline, 391 (64.8%) subjects (348 women, mean age 73.9 ± 6.5) were seropositive for *H. pylori*. Dementia prevalence was higher in the infected group (5.4% vs 1.4%, $P = .02$). After 20 years of follow-up, 148 incident cases of dementia were diagnosed. After controlling for age, sex, educational level, apolipoprotein E4 status, cardiovascular risk factors, and Mini-Mental State Examination score, *H. pylori* infection was determined to be a risk factor for developing dementia (hazard ratio = 1.46, $P = .04$).

CONCLUSION: This longitudinal population-based study provides additional epidemiological support to the hypothesis of an association between dementia and *H. pylori* infection, which may enhance neurodegeneration. *J Am Geriatr Soc* 61:74–78, 2013.

Key words: Alzheimer's disease; *Helicobacter pylori* infection; incidence; elderly

Dementia is a public health problem because of its frequency and medicosocial care cost. Alzheimer's disease (AD) is the leading type of dementia. There is no curative treatment for AD, and the identified risk factors are generally irreversible (e.g., advanced age, female sex, and presence of the apolipoprotein E allele $\epsilon 4$ (APOE- $\epsilon 4$)).¹ A link between persisting chronic infections (e.g., herpes simplex virus (HSV),² *Chlamydia pneumoniae*³) and AD has been explored. These infectious agents may elicit neuroinflammation and worsen AD lesions. *Helicobacter pylori*, a spiral-shaped gram-negative bacterium, may participate in AD pathophysiology by causing lifelong gastric inflammation. *H. pylori* infection affects approximately 25% of the French population, with a higher prevalence in elderly people, according to a cohort phenomenon.⁴ Acquired in childhood, this infection can induce a cascade of events leading to gastroduodenal diseases (ulcers, cancers)⁵ and extradigestive pathologies such as idiopathic thrombocytopenic purpura⁶ and may be involved in cardiovascular disease.⁷ Data regarding the link between *H. pylori* chronic infection and AD are contradictory. Two case-control studies have reported a higher prevalence of *H. pylori* infection in individuals with dementia. One study⁸ found higher levels of *H. pylori* immunoglobulin G (IgG) in individuals with vascular dementia and AD than in controls. Another study⁹

From the ^{*}INSERM, U853, F-33000, Bordeaux, France; [†]Laboratoire de Bactériologie, University of Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France; [‡]Pôle de Gériatrie Clinique, CHU Hôpitaux de Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France; and [§]INSERM, U897, F-33000, Bordeaux, France.

Address correspondence to Dr. Claire Roubaud Baudron, INSERM U853, Université Bordeaux Segalen, Carrière zone nord Bat 2B RDC, 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.
E-mail: claire.roubaud@chu-bordeaux.fr

DOI: 10.1111/jgs.12065

confirmed these results, showing a higher prevalence of *H. pylori* infection in gastric biopsy specimens in individuals with AD than in controls. A recent interventional study also concluded that successful *H. pylori* eradication may slow cognitive decline in AD¹⁰ and decrease mortality risk,¹¹ but another study¹² of 582 Japanese subjects did not confirm a greater prevalence of *H. pylori* infection in individuals with AD than in controls. These negative results are debatable because age and sex, known to be AD risk factors, were not comparable between cases and controls.¹³

The association between AD and *H. pylori* infection has never been studied prospectively. The main objective of this study was to determine whether chronic *H. pylori* infection could be a risk factor for developing dementia by studying a prospective cohort of elderly adults followed over a 20-year period.

SUBJECTS/MATERIALS AND METHODS

Population

The study population and methodology of the Personnes Agées QUID (PAQUID) cohort have been extensively described.¹⁴ Briefly, PAQUID is an ongoing prospective cohort study of normal and pathological cerebral aging composed of a randomly selected sample of 3,777 noninstitutionalized individuals aged 65 and older living in the southwest of France. The study began in 1988, and its main objective was to assess the incidence and predictors of dementia, including AD. Participants were followed for 20 years, and diagnoses of dementia were made using a two-stage design. The first stage was a systematic cognitive screening conducted by trained psychologists, with a follow-up every 2 to 3 years after the baseline visit. Cognitive performances were evaluated using a comprehensive battery of neuropsychological tests including the Mini-Mental State Examination (MMSE)¹⁵ and *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition, Revised*, criteria.¹⁶ The second stage, performed by a neurologist, consisted of a confirmation of cognitive dysfunction. The AD diagnosis was made according to the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria.¹⁷ During the first-year visit (1989), a subsample of 603 volunteers agreed to give a blood sample. Serum samples were frozen and stored in liquid nitrogen for subsequent analysis. Data were collected on sociodemographic characteristics (age, sex), education level (at least the first French diploma after primary school vs less educated¹⁸), clinical characteristics (height, weight, cognition using the MMSE, presence or absence of vascular comorbidities: hypertension, coronary disease, and stroke), and incidence rate of dementia over 20 years. Overweight was defined as a body mass index (weight in kilograms divided by the square of height in centimeters) greater than 25.0. For the cumulative incidence rate of dementia, 24 subjects with dementia at inclusion and 11 who declined to participate in follow-up after the blood sampling were excluded, leaving 568 subjects followed up for 20 years.

Ethics

Subjects who agreed to participate in the study provided written informed consent. The ethics committee of the University Hospital of Bordeaux approved the study.

H. pylori Infection Diagnosis

A serological assay for *H. pylori* IgG antibodies was performed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Pyloriset EIA-G kit, Orion Diagnostica, Espoo, Finland).¹⁹ A positive result was defined as a titer of antibodies of 20 IU/mL or greater, according to the manufacturer's recommendations. The HELICO BLOT 2.1 (Genelabs Diagnostics, Singapore Science Park) was used for the detection of antibodies to specific proteins of *H. pylori*, including pathogenic factors (e.g., CagA), as previously described.²⁰ Positive *H. pylori* infection was based on serology or immunoblot positivity. Serology was performed on serum samples stored in 1989.

Apolipoprotein E Phenotyping

Serum samples were obtained during the first year of follow-up (1989–1990) and frozen at -196°C until determination of phenotype. The apolipoprotein E phenotype was determined using isoelectric focusing of delipidated plasma samples followed by immunoblotting. The validity of the use of stored serum for this purpose has been previously described.²¹

Statistical Methods

A descriptive and comparative analysis was conducted using the chi-square or Fisher exact test for qualitative variables and the Student *t* test or Wilcoxon rank sum test for quantitative variables. Results with $P < .05$ were considered to be significant. First, the cross-sectional association between *H. pylori* status and explanatory variables was analyzed using a logistic regression model on 603 subjects. Second, after excluding prevalent cases of dementia and subjects who were not followed, resulting in a sample of 568 subjects, a Cox proportional hazards model controlled for age, sex, educational level, apolipoprotein E4 status, baseline MMSE score, obesity, and vascular comorbidities was used to study the risk of developing dementia and its subtypes during the 20 years of follow-up. All statistical analyses were performed using SAS, version 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

RESULTS

Six hundred three subjects were included in this study at baseline. The mean age was 73.9 ± 6.5 ; there were 255 men and 348 women. Three hundred ninety-one (64.8%) subjects were positive for *H. pylori*. Lower education level, older age, overweight, and hypertension were significantly associated with *H. pylori* infection in the univariate analysis (Table 1).

Mean baseline MMSE scores were lower in *H. pylori*-positive subjects (Table 1). Most of the *H. pylori*-negative subjects performed well on the MMSE, with 89.6% scoring

Table 1. Sample Characteristics at Baseline According to *Helicobacter pylori* Status in Univariate and Multivariate Analysis: Personnes Agées QUID Study (N = 603)

Characteristic	Univariate Analysis			Multivariate Analysis	
	<i>H. pylori</i> Negative, n = 212	<i>H. pylori</i> Positive, n = 391	P-Value	Odds Ratio (95% Confidence Interval)	P-Value
Age, mean \pm SD	73.1 \pm 6.4	74.3 \pm 6.5	0.02	0.99 (0.97–1.03)	0.95
Female, n (%)	124 (58.5)	224 (57.3)	0.79	0.85 (0.58–1.26)	0.42
Low educational level, n (%)	38 (17.9)	132 (33.8)	<0.001	1.94 (1.16–3.23)	0.01
Hypertension, n (%)	163 (76.9)	332 (84.9)	0.02	1.51 (0.93–2.46)	0.09
Stroke, n (%)	11 (5.2)	13 (3.3)	0.28		
Ischemic heart disease, n (%)	38 (17.9)	88 (22.5)	0.17		
Diabetes mellitus, n (%)	18 (8.5)	35 (9.0)	0.88		
Apolipoprotein E ϵ 4 allele, n (%)	50 (23.6)	84 (21.5)	0.61		
Overweight, n (%)	76 (36.4)	185 (47.9)	0.007	1.42 (0.70–2.90)	0.33
Mini-Mental State Examination score, mean \pm SD ^a	26.9 \pm 2.6	25.6 \pm 4.2	<0.001	0.93 (0.85–1.01)	0.09
Dementia at baseline, n (%)	3 (1.4)	21 (5.4)	0.02	1.65 (1.05–2.60)	0.03

SD = standard deviation.

^aNot included in the multivariate analysis because of colinearity with dementia.

24 or more, whereas 50.6% of the *H. pylori*-positive subjects scored 24 or more ($P = .001$). The prevalence of dementia was higher in *H. pylori*-positive subjects (5.4% vs 1.4%, $P = .02$). After controlling for several factors (Table 1), *H. pylori* infection was more frequent in subjects with a low educational level (odds ratio (OR)=1.94, $P = .01$) and in those with dementia (OR=1.65, $P = .003$).

After 20 years of follow-up, 105 (28.9%) of the 364 *H. pylori*-positive subjects and 43 (21.1%) of the 204 *H. pylori*-negative subjects had developed dementia. A first model was fitted with potential risk factors for dementia, including age, sex, apolipoprotein E4 status, cardiovascular risk factors, weight, and MMSE score (Table 2). *H. pylori* positivity was then introduced to evaluate potential confounding of this variable and was still found to be associated with greater risk (hazard ratio (HR)=1.46, $P = .04$) of developing dementia (Table 2).

No confounding from *H. pylori* was observed with cardiovascular risk factors.

DISCUSSION

There is increasing interest in the effect of *H. pylori* infection on different extragastric diseases.²² A few case-control studies have reported a significant association between chronic *H. pylori* infection and AD,^{8,9,12} and results of the present prospective study confirm and strengthen this link, with a significantly greater risk of developing dementia in *H. pylori*-positive subjects.

At baseline, infected subjects were more cognitively impaired and had a higher prevalence of dementia. The *H. pylori*-positive subjects were also older, were more likely to be male, and had less schooling than *H. pylori*-negative subjects. They also had a poorer health profile; hypertension

Table 2. Hazard Ratio of Developing Dementia: Cox Model, Personnes Agées QUID Study, 1989–2009 (N = 568)

Factor	Initial Model			Model Controlled for <i>Helicobacter pylori</i> Seropositivity		
	Hazard Ratio	95% Confidence Interval	P-Value	Hazard Ratio	95% Confidence Interval	P-Value
<i>H. pylori</i> seropositivity				1.46	1.01–2.11	0.044
Age	1.14	1.10–1.17	<0.001	1.13	1.10–1.17	<0.001
Female	1.61	1.10–2.35	0.001	1.63	1.20–2.39	0.001
Low educational level	1.10	0.74–1.63	0.65	1.02	0.69–1.52	0.92
Hypertension	0.80	0.53–1.21	0.29	0.79	0.52–1.19	0.26
Stroke	1.26	0.49–3.25	0.64	1.44	0.55–3.73	0.45
Ischemic heart disease	1.53	1.02–2.29	0.04	1.49	1.00–2.24	0.05
Diabetes mellitus	1.50	0.78–2.91	0.23	1.54	0.80–2.96	0.20
Apolipoprotein E 4 allele	2.13	1.44–3.14	<0.001	2.14	1.45–3.16	<0.001
Overweight	0.77	0.42–1.38	0.37	0.75	0.42–1.36	0.35
Baseline Mini-Mental State Examination score	0.90	0.84–0.96	0.001	0.90	0.85–0.96	0.001

was more frequent, and they were more frequently overweight. Investigation of the occurrence of dementia after 20 years of follow-up strengthens these results, finding a 45% greater risk of developing dementia in *H. pylori*-positive subjects.

These findings support the hypothesis of a potential effect of *H. pylori* infection on dementia. It may be that chronic *H. pylori* infection potentializes the accumulation of cardiovascular risk factors during aging, leading to greater risk of developing dementia or worsening cognitive decline. Epidemiological studies have suggested that *H. pylori* infection may be an independent risk factor for ischemic cerebrovascular diseases^{23,24} by increasing atherosclerosis, especially for stroke caused by small-artery occlusion.²⁵ In contrast, a prospective cohort study of 9,953 older adults (aged 50–75) did not confirm an association between *H. pylori* infection, chronic gastric atrophy, and stroke.²⁶ A recent study reported that individuals with AD with *H. pylori* infection had more-severe dementia (lower MMSE score and higher cerebrospinal fluid (CSF) phosphorylated protein tau level) and a higher cerebrovascular load (Fazekas score).²⁷

One mechanism by which *H. pylori* infection may play a role in neuron damage leading to dementia is a higher plasma homocysteine level, leading to endothelial damage, cerebrovascular lesions, and ultimately neurodegeneration.²⁸ Chronic atrophic gastritis due to *H. pylori* infection could result in low vitamin B12 and folate levels, causing secondary hyperhomocysteinemia. In addition, systemic and chronic inflammation leading to atherosclerosis could increase neuroinflammation. A previous study²⁹ found that acute and chronic systemic inflammation were associated with neuron damage and cognitive decline in humans, regardless of the etiology, like in animal models,³⁰ hypothesizing that the degenerating central nervous system produced an amplified cytokine response to systemic inflammation. Moreover, it was recently reported that *H. pylori*-positive individuals with AD had greater systemic (plasma fibrinogen) and neuro-CSF (tumor necrosis factor- α and interleukin-8) inflammation.²⁷

Other authors have proposed other possible pathogenic mechanisms, such as disruption of the blood–brain barrier caused by the release of inflammatory mediators, promoting the entry of immune cells, and *H. pylori* proteins in the central nervous system, resulting in the development of AD pathologies by inducing A β peptide fibril formation.^{31,32}

One limit of the current study was the lack of power of the analyses. Only 603 subjects in the cohort underwent blood sampling and were included. Because of the small number of non-AD dementia (especially vascular dementia), a specific analysis on the subtypes of dementia was not possible, although this sample offered the opportunity to analyze the association between *H. pylori* infection and dementia on an elderly population-based sample. Moreover the majority of dementia is known to be mixed in this aged group. In addition, the selection of subjects for the blood sample was from a volunteer base, making the comparison with the entire cohort uncertain. Another limit of the study could be the method used to diagnose *H. pylori* infection (serum antibody detection); the criterion standard is gastric histology and culture, which were technically and ethically impossible in this study. An ELISA test with high

sensitivity and specificity that has ranked among the best in this respect in comparative studies was used.³³ An immunoblot was also performed. Nevertheless, performance of *H. pylori* serology in elderly adults remains controversial. Because *H. pylori* antibodies may remain for months after *H. pylori* eradication, serology indicates a current or past infection.³⁴ Nevertheless, although infection diagnosed using serology may not be detected using other methods, the infection may nevertheless be real, especially in the case of atrophy³⁵ or antisecretory drug consumption.⁶ Serology seems to be an appropriate diagnostic test for elderly adults because of the high prevalence of gastric atrophy and proton pump inhibitor consumption.³⁶

In conclusion, *H. pylori* infection is associated with greater prevalence and incidence of dementia, strengthening the hypothesis. An indirect mechanism through an increase in cardiovascular burden might explain such a result. Further studies are needed to explore this association more thoroughly.

ACKNOWLEDGMENTS

Conflict of Interest: The PAQUID study was supported by grants from Fondation de France, Novartis Laboratories, IPSEN Laboratories, Conseil Général de la Gironde, Conseil Régional d'Aquitaine, and SCOR Insurance (France).

Francis Mégraud has received grants from Aptalis, Danone Research, and Glaxo Smithkline and participates in speaker forums for Aptalis and Astra Zeneca.

Jean-François Dartigues has received grants from IPSEN and Novartis and has received honoraria from IPSEN, Novartis, and Merck Serono.

Author Contributions: Roubaud-Baudron: data analysis and interpretation, drafting of manuscript. Letenneur: statistical analysis, data analysis and interpretation, critical review of the manuscript. Langlais: statistical analysis and data interpretation. Buissionnière: bacteriological analysis. Dartigues: co-manager of PAQUID project, statistical analysis, data interpretation, critical review of manuscript. Mégraud: study concept, critical revision of manuscript. Salles: study concept, data analysis and interpretation, critical review of manuscript.

Sponsor's Role: The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of manuscript.

REFERENCES

1. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. JAMA 1997;278:1349–1356.
2. Wozniak MA, Mee AP, Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. J Pathol 2009;217:131–138.
3. Hammond CJ, Hallock LR, Howanski RJ et al. Immunohistological detection of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's disease brain. BMC Neurosci 2010;11:121.
4. Banatvala N, Mayo K, Megraud F et al. The cohort effect and *Helicobacter pylori*. J Infect Dis 1993;168:219–221.
5. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med 2002;347:1175–1186.
6. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence Consensus Report. Gut 2012;61:646–664.

7. Whincup P, Danesh J, Walker M et al. Prospective study of potentially virulent strains of *Helicobacter pylori* and coronary heart disease in middle-aged men. *Circulation* 2000;101:1647–1652.
8. Malaguamera M, Bella R, Alagona G et al. *Helicobacter pylori* and Alzheimer's disease: A possible link. *Eur J Intern Med* 2004;15:381–386.
9. Kountouras J, Tsolaki M, Gavalas E et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer disease. *Neurology* 2006;66:938–940.
10. Kountouras J, Boziki M, Gavalas E et al. Eradication of *Helicobacter pylori* may be beneficial in the management of Alzheimer's disease. *J Neurol* 2009;256:758–767.
11. Kountouras J, Boziki M, Gavalas E et al. Five-year survival after *Helicobacter pylori* eradication in Alzheimer disease patients. *Cogn Behav Neurol* 2010;23:199–204.
12. Shiota S, Murakami K, Yoshiiwa A et al. The relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer's disease in Japan. *J Neurol* 2011;258:1460–1463.
13. Kountouras J, Zavos C, Boziki M et al. Association between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer's disease in Japan. *J Neurol* 2011;258:2086.
14. Dartigues JF, Gagnon M, Barberger-Gateau P et al. The Paquid epidemiological program on brain ageing. *Neuroepidemiology* 1992;11(Suppl 1):14–18.
15. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. 'Mini-mental state': A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12:189–198.
16. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 3rd Ed., Revised. Washington, DC: American Psychiatric Association. 1987.
17. McKhann G, Drachman D, Folstein M et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984;34:939–944.
18. Letenneur L, Gilleron V, Commenges D et al. Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;66:177–183.
19. Granberg C, Mansikka A, Lehtonen OP et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by using pyloriset EIA-G and EIA-A for detection of serum immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies. *J Clin Microbiol* 1993;31:1450–1453.
20. Monteiro L, Bergey B, Gras N et al. Evaluation of the performance of the Helico Blot 2.1 as a tool to investigate the virulence properties of *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:676–679.
21. Havekes LM, De Knijff P, Beisiegel U et al. A rapid micromethod for apolipoprotein E phenotyping directly in serum. *J Lipid Res* 1987;28:455–463.
22. Suzuki H, Franceschi F, Nishizawa T et al. Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2011;16(Suppl 1):65–69.
23. Grau AJ, Bugge F, Lichy C et al. *Helicobacter pylori* infection as an independent risk factor for cerebral ischemia of atherothrombotic origin. *J Neurol Sci* 2001;186:1–5.
24. Markus HS, Mendall MA. *Helicobacter pylori* infection: A risk factor for ischaemic cerebrovascular disease and carotid atheroma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:104–107.
25. Heuschmann PU, Neureiter D, Gesslein M et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* and risk of ischemic stroke subtypes: Results from a population-based case-control study. *Stroke* 2001;32:2253–2258.
26. Schottker B, Adamu MA, Weck MN et al. *Helicobacter pylori* infection, chronic atrophic gastritis and major cardiovascular events: A population-based cohort study. *Atherosclerosis* 2012;220:569–574.
27. Roubaud-Baudron C, Krolak-Salmon P, Quadrio I et al. Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease: Preliminary results. *Neurobiol Aging* 2012;33:1009.
28. Seshadri S, Beiser A, Selhub J et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346:476–483.
29. Holmes C, Cunningham C, Zotova E et al. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* 2009;73:768–774.
30. Cunningham C, Wilcockson DC, Campion S et al. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J Neurosci* 2005;25:9275–9284.
31. Ge R, Sun X. The in vivo functions of a histidine-rich protein Hpn in *Helicobacter pylori*: Linking gastric and Alzheimer's diseases together? *Med Hypotheses* 2011;77:788–790.
32. Kountouras J, Zavos C, Gavalas E et al. Normal-tension glaucoma and Alzheimer's disease: *Helicobacter pylori* as a possible common underlying risk factor. *Med Hypotheses* 2007;68:228–229.
33. Burucoa C, Delchier JC, Courillon-Mallet A et al. Comparative evaluation of 29 commercial *Helicobacter pylori* serological kits. *Helicobacter* 2012 (in press).
34. Liston R, Pitt MA, Banerjee AK. IgG ELISA antibodies and detection of *Helicobacter pylori* in elderly patients. *Lancet* 1996;347:269.
35. Kokkola A, Rautelin H, Puolakkainen P et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in patients with atrophic gastritis: Comparison of histology, 13C-urea breath test, and serology. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:138–141.
36. Salles-Montaudo N, Dertheil S, Broutet N et al. Detecting *Helicobacter pylori* infection in hospitalized frail older patients: The challenge. *J Am Geriatr Soc* 2002;50:1674–1680.

III. L'INFECTION A *HELICOBACTER PYLORI* EST-ELLE ASSOCIEE A UNE AUGMENTATION DE LA SEVERITE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ?

Article 2. Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease: preliminary results. Roubaud-Baudron C, Krolak-Salmon P, Quadrio I, Mégraud F, Salles N. Neurobiol Aging. 2012 May;33(5):1009.e11-9.

A la suite de l'étude sur la cohorte PAQUID, nous avons émis l'hypothèse que l'infection à *H. pylori* pouvait majorer les lésions cérébrales de la maladie d'Alzheimer par des mécanismes inflammatoires ou vasculaires. Pour tester cette hypothèse, nous avons voulu comparer des données cognitives, inflammatoires et vasculaires dans une population de patients atteints de maladie d'Alzheimer en fonction de leur statut infectieux. Pour cela nous avons travaillé en collaboration avec Pierre Krolak-Salmon, neurogériatre (Hospices civils de Lyon, INSERM U1028) et NeuroBioTec.

Neurobiotec fait partie du Centre de Ressources Biologiques (CRB) des Hospices Civils de Lyon (HCL); il s'agit d'une biothèque, créée en 1997, comportant de multiples collections d'échantillons de matériels biologiques en association avec les données cliniques. Nous avons travaillé sur la collection « démences » qui dispose de sérum et de liquide céphalorachidien (LCR) de patients atteints de démences. Parmi les patients déments de cette collection, nous avons sélectionné les patients atteints de maladie d'Alzheimer (n=53). Nous avons réalisé des sérologies *H. pylori* sur leur sérum et comparé des marqueurs cognitifs, vasculaires et inflammatoires. Le diagnostic de maladie d'Alzheimer reposait sur les bilans neuropsychologiques, le dosage des biomarqueurs du LCR (peptide A β ₁₋₄₂, protéine Tau et protéine Tau phosphorylée à la position 181) et l'imagerie cérébrale (IRM). Bien que l'examen anatomopathologique reste la méthode de référence pour le diagnostic de maladie d'Alzheimer, l'utilisation de différents nouveaux outils décrit par Dubois *et al.* permet d'affiner l'approche diagnostique (71).

Nous avons retrouvé en analyse multivariée que les patients infectés par *H. pylori* avaient un score MMSE plus bas. Les taux dans le LCR de l'interleukine-(IL)8 et du TNF- α étaient plus élevés en cas d'infection, en revanche, en analyse multivariée, on retrouvait une diminution

du taux plasmatique de IL-1 β associée à l'infection. Les patients infectés n'avaient pas de lésions cérébrovasculaires plus importantes à l'IRM.

Cet article a fait l'objet d'un commentaire par le Docteur Victor Cardenas (**Commentaire article 2**), épidémiologiste et médecin à « *University of Texas HSC at Houston School of Public Health* » dans la revue *Neurobiology of Aging*. La remarque principale portait sur la variable dépendante utilisée pour l'analyse multivariée dans notre étude, à savoir le statut infectieux. D'après Cardenas *et al.* le score du MMSE aurait dû être choisi comme variable dépendante. Nous avons apporté une réponse à ce commentaire. Nous avons réalisé une régression linéaire en utilisant le score MMSE comme variable dépendante, et ceci a permis de confirmer que l'infection à *H. pylori* était significativement associée à une diminution du score.

Commentaire Article 2- réponse. Roubaud-Baudron C, Panhard X, Krolak-Salmon P, Quadrio I, Mégraud F, Salles N. Change of the dependent variable. *Neurobiol Aging*. 2013 Jun;34(6):e1.

Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease: preliminary results

Claire Roubaud-Baudron^{a,b,c,*}, Pierre Krolak-Salmon^{d,e,f}, Isabelle Quadrio^g,
Francis Mégraud^{a,b}, Nathalie Salles^{a,b,c}

^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U853, Bordeaux, France

^b Univ. Bordeaux, Laboratoire de Bactériologie, F-33000 Bordeaux, France

^c Pôle de gériatrie clinique, CHU Hôpitaux de Bordeaux, Bordeaux, France

^d Centre de Mémoire, de Ressource et de Recherche, Hôpital des Charpennes, Hospices Civils de Lyon, France

^e University Lyon 1, Lyon, France

^f Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1028, CNRS UMR5292, Lyon Neuroscience Research Center, Brain Dynamics and Cognition Team, Lyon, France

^g Laboratoire de Neurobiologie, Centre de Biologie et Pathologie Est - GHE Hospices Civils de Lyon, Bron Cedex, France

Received 21 February 2011; received in revised form 12 October 2011; accepted 21 October 2011

Abstract

Recent case-control studies reported an association between *H. pylori* infection and Alzheimer's disease (AD). Our aim was to compare cognitive impairment, neuroinflammation, and cerebrovascular lesion load in a group of AD patients according to their *H. pylori* status. For the 53 AD patients included, we assessed: clinical data (vascular comorbidities and cognitive assessment), biological data (especially fibrinogen, homocysteine levels, apolipoprotein E4 genotype; cerebrospinal fluid [CSF] total tau protein [Tau], phospho-tau₁₈₁ protein [pTau₁₈₁]), and amyloid beta peptide levels, serum/CSF-cytokines (interleukin [IL]-1 β , IL-6, IL-8, tumor necrosis factor [TNF]- α) and pepsinogen I/pepsinogen II (PgI/PgII) ratio, and cerebrovascular lesion load (magnetic resonance imaging [MRI] fluid-attenuated inversion recovery [FLAIR] with the Fazekas and Schmidt scale). *H. pylori* infection was diagnosed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblot test. *H. pylori* infection was associated with a decreased Mini Mental State Examination (MMS) ($p = 0.024$), and higher CSF pTau₁₈₁ ($p = 0.014$) and tau ($p = 0.021$) levels. A decreased PgI/II ratio (i.e., an increased gastric atrophy) was associated with the infection ($p = 0.005$). Homocysteine levels were positively correlated to Fazekas score ($r = 0.34$; $p = 0.032$) and to *H. pylori* immunoglobulin (Ig)G levels ($r = 0.44$; $p = 0.001$). Higher CSF cytokine levels (IL-8, $p = 0.003$; TNF- α , $p = 0.019$) were associated with the infection, but systemic inflammation results were controversial. Finally, in multivariate analysis, a lower MMSE score (odds ratio [OR], 0.83 [0.72–0.97]; $p = 0.017$), plasma IL-1 β level (OR, 0.31 [0.11–0.87]; $p = 0.025$), an increased gastric atrophy, i.e., a lower PgI/PgII ratio (OR, 0.63 [0.43–0.93]; $p = 0.020$) were still associated with the infection. AD patients infected by *H. pylori* tended to be more cognitively impaired. Studies are needed to attest to the impact of *H. pylori* infection on AD course, especially on cerebrovascular lesions and neuroinflammation.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Helicobacter pylori* infection; Alzheimer's disease; CSF biomarkers; cerebrovascular lesions

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the main cause of dependency and disability in the elderly, and its incidence is

currently increasing at a rate of 220,000 new cases per year in France (Helmer et al., 2006). No curative treatment for dementia is available, and most of the currently identified risk factors such as age, sex, and genetic factors like apolipoprotein E allele $\epsilon 4$ are not subject to intervention (Farrer et al., 1997). It has therefore become urgent to identify risk factors on which interventions would be possible. As an attempt to determine the etiology of late-onset AD and to search for new treatment, several groups have investigated

* Corresponding author at: Université Bordeaux Segalen, INSERM U853, Laboratoire de bactériologie, 33076 Bordeaux cedex, France. Tel.: +33 5 57 65 66 10; fax : +33 5 57 65 62 24.

E-mail address: claire.roubaud@chu-bordeaux.fr (C. Roubaud-Baudron).

the association between various infectious agents and AD. The first agent concerned was herpes simplex virus type 1 (HSV-1). HSV-1 may persist in a quiescent but persistent form known as latent infection, notably in the peripheral nervous system rather than in the central nervous system, and the mechanism for how HSV-1 may reactivate in the hippocampus remains unknown (Itzhaki et al., 1997). However the involvement of HSV is still debated. Wozniak and Itzhaki provided evidence that supports a causal role for HSV-1 in AD. The cascade of events leading to AD might involve reactivation of latent HSV-1 in the brain. Infection would cause both direct and indirect damage, inflammatory-mediated damage, and in apolipoprotein E allele $\epsilon 4$ carriers the damage would be greater, possibly through greater viral replication and spread, eventually leading to AD (Wozniak and Itzhaki, 2010).

Another major infectious pathogen incriminated was *Chlamydia pneumoniae* as up to 90% of AD brain biopsy specimens may be positive for *C. pneumoniae* as detected by polymerase chain reaction (PCR), especially in brain regions that exhibit AD pathology (Balin et al., 1998). However, in an interventional study in 100 patients, Loeb et al. (2004) could not prove a definite *C. pneumoniae* involvement in AD pathophysiology.

Recent observations also showed that several types of spirochetes, including *Borrelia burgdorferi* and oral *Treponema* may be involved in the pathogenesis of AD, but results remain controversial (Miklosy, 2008).

More recently, an association between AD and *Helicobacter pylori* infection was reported. *H. pylori* infection is a chronic infection usually acquired in childhood and which remains for life when no specific treatment is given. An increase in *H. pylori* prevalence with age is explained by changes in socioeconomic conditions. In fact, studies reported that when cohorts of 70-year-old subjects born in 1901 or 1902 and 1922 were compared, the latter cohort showed a significantly lower *H. pylori* positive serology. In Western Europe there is still more than a third of the population older than 60 years who are infected. *H. pylori* is a heterogenous bacterial species. Genomic studies have shown that some strains may harbor a pathogenicity island namely *cag* (*cag* PAI), which encodes a type IV secretion system and 1 of its effectors, CagA, which triggers a strong inflammatory response (Backert and Selbach, 2008).

Recent data suggested that *H. pylori* infection plays a role in extradigestive diseases (Figura et al., 2010) and in AD but controversial results persist. Indeed, in addition to 2 case-control studies pointing out an association between *H. pylori* infection and AD (Kountouras et al., 2006; Malaguarnera et al., 2004), an interventional study has shown that *H. pylori* eradication positively influences AD manifestations, especially cognitive decline (Kountouras et al., 2009). On the contrary, Shiota et al. (2011) showed negative results, but the authors based their diagnosis on antibody

tests on urine samples which has been shown to be unreliable (Leodolter et al., 2003).

Preliminary results of a cohort study conducted in our laboratory concluded that *H. pylori* infection was a significant risk factor for developing AD (submitted for publication). We hypothesized that *H. pylori* infection could act as a trigger in the clinical revelation of AD or in the accumulation of AD lesions via cerebral hypoperfusion due to atherosclerosis, or via an exacerbation of neuroinflammation.

In order to test this hypothesis, we have compared, in this study, the cognitive impairment, cerebrospinal fluid (CSF)- β amyloid_{1–42} ($A\beta_{1–42}$), -total tau (Tau), and -phosphorylated tau (pTau₁₈₁) proteins, cerebrovascular lesions assessed by brain magnetic resonance imaging (MRI), and markers of neuroinflammation in a group of AD patients according to their *H. pylori* status.

2. Methods

2.1. Study population

Since 2003, serum and CSF samples from 213 demented patients were collected in Lyon, France by NeuroBioTec, CRB HCL (Hospices Civils de Lyon, France). Written informed consent allowing research, including genetic research, was obtained from each patient participating in the study. The study was approved by the local Ethics Committee (CPP).

2.1.1. Inclusion criteria

Among the 213 patients, we selected those who responded to criteria for the diagnosis of AD, i.e., the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) criteria (McKhann et al., 1984), associated with the presence of medial temporal lobe atrophy on MRI (Fox and Schott, 2004) and abnormal CSF biomarkers. We chose, after a review of the literature and following the manufacturer's recommendations the association of the following cutoff values: $A\beta_{1–42}$ concentration < 600 pg/mL, Tau concentration > 300 pg/mL, pTau₁₈₁ concentration > 60 pg/mL, Innotech amyloid tau index (IATI): $A\beta_{1–42}/(240 + 1.18[\text{Tau}]) < 0.8$ (Hulstaert et al., 1999).

2.1.2. Exclusion criteria

In order to exclude hypothyroidism and Creutzfeldt-Jakob disease, specific clinical signs were collected as well as thyroid-stimulating hormone (TSH) (Architect i2000SR TSH Assay; Abbott, Princeton, NJ, USA) and CSF-protein 14-3-3 (Western Blot immunoassay antibody K19 β anti 14.3.3; Signet Laboratories, Dedham, MA, USA) measurements. Presumed AD cases without CSF samples were excluded. Non-AD dementia were also excluded.

2.1.3. Patient's clinical characteristics

The following clinical data were collected: age, gender, and atherosclerosis risk factors (weight, size, body mass index [BMI; calculated as weight [kg]/height [m²], past or active tobacco use, hypertension, diagnosed or treated diabetes mellitus and cholesterol).

All the included patients were submitted to a neuropsychological evaluation. The Mini Mental State Examination (MMSE) (Folstein et al., 1975) and the Frontal Assessment Battery (FAB) (Dubois et al., 2000) were systematically carried out to rate global cognitive ability. Episodic verbal memory was assessed by the Free and Cued Selective Recall Reminding Test (FCSRT) in patients with an MMSE score above 15 (Grober et al., 1988).

2.2. Methods

2.2.1. Biological data

2.2.1.1. Measurement of CSF-biomarkers. CSF concentrations of $A\beta_{1-42}$, Tau, and pTau₁₈₁ were analyzed. CSF samples were obtained by standard procedures (Straus et al., 2006), and were aliquoted into individual polypropylene tubes without preservative, and stored at -80°C until assayed. CSF samples were analyzed using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Tau, pTau₁₈₁, and $A\beta_{1-42}$ level, with specific kits (Innotest β -Amyloid[1–42], Innotest hTAU-Antigen, and Innotest phospho-tau 181p; Innogenetics, Ghent, Belgium; respectively). The Tau/p-Tau₁₈₁ and Tau/ $A\beta_{1-42}$ ratios were calculated (Kester et al., 2009).

2.2.1.2. Atherosclerosis risk factors. The low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol was estimated from the Friedewald equation, using Architect C16000 (Abbott), the fasting blood glucose by Architect C16000 (Abbott) and the homocysteine level was measured using a sandwich ELISA (Axis Homocysteine EIA, Axis-Shield, Oslo, Norway). The genotype of apolipoprotein E was determined for each patient sample as previously described (Hixson and Vernier, 1990), i.e., by polymerase chain reaction and *HhaI* enzymatic restriction.

2.2.1.3. Inflammatory markers. Plasma and CSF cytokines, i.e., interleukin (IL)-6, IL-8, IL-1 β , and tumor necrosis factor- α (TNF- α), were assessed by an ELISA using biotinylated antibodies and streptavidin-DyLight 800 Fluor conjugate (Search-Light human cytokine array, Aushon BioSystems, Billerica, MA, USA). Microplates were interpreted by using the SearchLight Array Analysis Software (Aushon BioSystems) after scanning (Odyssey, infrared imaging systems, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). The other markers assessed were neopterin measured as previously described (Nancey et al., 2008), plasma C-reactive protein with Architect C16000 (Abbott), and fibrinogen by STA compact analyzer (Stago, Asnières sur Seine, France).

2.2.1.4. Determination of the *Helicobacter pylori* status. Serum samples were tested for immunoglobulin (Ig)G-specific *H. pylori* antibodies both by ELISA and immunoblot. For the detection of *H. pylori*-IgG by ELISA, the Pyloriset EIA-G kit (Orion Diagnostica, Espoo, Finland) was used following the manufacturer's recommendations. A positive result was defined as an antibody titer greater than or equal to 20 IU/mL. For the detection of CagA IgG antibody by immunoblot, the Helico Blot 2.1 kit (Genelabs Diagnostics, Singapore Science Park) was used. The immunoblot test was performed according to the manufacturer's instructions as previously described.

Patients were considered as *H. pylori* positive when ELISA or immunoblot were positive.

2.2.1.5. Measurement of gastric atrophy. In our study, gastric atrophy lesions were defined by a noninvasive method measuring pepsinogen I (PgI), and pepsinogen II (PgII) levels, and PgI/PgII ratio (Pepsinogen I and II, ELISA kit 96, Biohit Oy, Helsinki, Finland) (Väänänen et al., 2003).

All ELISA procedures were performed in duplicate.

2.2.2. Morphological data

2.2.2.1. Scoring white matter and periventricular hyperintensities. Brain MRI cerebrovascular staging was blindly carried out by 1 neurologist using the Fazekas and Schmidt scale (Fazekas et al., 1987). The different types of hyperintense signal abnormalities surrounding the ventricles and in the deep white matter were evaluated as following: periventricular hyperintensity (PVH) was graded as 0 = absent, 1 = "caps" or pencil-thin lining, 2 = smooth "halo," 3 = irregular PVH extending into the deep white matter. Separate deep white matter hyperintense signals were rated as 0 = absent, 1 = punctuate foci, 2 = beginning confluence of foci, 3 = large confluent areas. Then we added the 2 scores for a 6-point score.

2.3. Statistical analysis

Biological and clinical data were compared according to *H. pylori* status by the Mann-Whitney test for quantitative variables and χ^2 test for categorical variables. Differences with a *p* value of less than 0.05 were considered significant.

A binary logistic regression model with *H. pylori* status as the dependant dichotomous variable was used to determine variables associated with infection. Clinical and biological data resulting in a *p*-value less than 0.10 in univariate analysis were then entered into a multivariate logistic-regression model. A backward selection method was used to obtain a model in which all data had a *p*-value less than 0.05. Continuous variables were split into quartiles to study the effect between them and *H. pylori* status. The first quartile was taken as reference. If the relation was not linear, we transformed the continuous variable into a categorical variable with the more appropriate quartile as a cutoff.

Table 1
Patient's characteristics (total $n = 53$)

Characteristics	n (%)
Female gender	30 (57)
Age (y) mean \pm SD (range)	68.5 \pm 8.7 (51–88)
MMSE mean \pm SD (range)	18.5 \pm 6.4 (1–28)
Apolipoprotein E	
Genotype $\epsilon 4/\epsilon 4$	10 (19)
Genotype $\epsilon 4/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 2$	20 (38)
Genotype $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 2$	18 (33)
ND	5 (9)
<i>Helicobacter pylori</i> status, mean \pm SD (range)	
<i>H. pylori</i> -IgG (IU/mL)	49.1 \pm 69.9 (7.5–271)
<i>H. pylori</i> -positive	20 (38)
CagA-positive	16 (80)
<i>H. pylori</i> -negative	33 (62)

SD according to a 30-point scale.

Key: IgG, immunoglobulin G; MMSE, Mini-Mental State Examination; ND, not determined.

Bivariate correlations were tested by Spearman test between homocysteine levels, *H. pylori*-IgG concentrations, PgI/PgII ratios, and Fazekas score, 2 by 2. All statistics were performed using SPSS 16.0F for Windows software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Population characteristics

The NeuroBioTec dementia collection (plasma or CSF collection) was composed of 77 AD, 64 fronto-temporal dementia, 14 corticobasal degeneration, 22 dementia with Lewy bodies, 8 vascular dementia, 4 Creutzfeldt-Jakob disease, and 24 other dementias. Only 53 patients were diagnosed AD with available CSF markers. As shown in Table 1, included patients had identified risk factors of AD, i.e., mean age higher than 65 years, female gender, and overrepresentation of $\epsilon 4$ alleles of apolipoprotein E. A total of 20 of the 53 (38%) patients were positive for *H. pylori* infection and among them 16 patients (80%) were *H. pylori*-CagA positive. Table 2 shows patient characteristics according to their *H. pylori* status.

3.2. *H. pylori* status, cognitive impairment, and CSF biomarker characteristics

H. pylori-positive patients had higher CSF-Tau ($p = 0.021$) and CSF-pTau₁₈₁ ($p = 0.014$) concentrations compared with *H. pylori*-negative patients. The CSF-A β _{1–42} level was not significantly lower in *H. pylori*-positive patients ($p = 0.20$). Mean MMSE was lower in the positive group ($p = 0.024$) and was negatively correlated with the CSF-Tau₁₈₁ and CSF-Tau concentrations (Spearman test, $r = -0.33$, $p = 0.014$ and $r = -0.35$, $p = 0.022$, respectively). We failed to find a significant difference in the pTau/Tau ratio according to *H. pylori* status (*H. pylori*-negative 0.147 ± 0.0310 vs. *H. pylori*-positive $0.137 \pm$

0.0370 ; $p = 0.273$), but the Tau/A β _{1–42} ratio was significantly higher in the group of infected patients (*H. pylori*-negative 1.92 ± 1.15 vs. *H. pylori*-positive 3.35 ± 2.72 ; $p = 0.009$).

Mean FAB ($p = 0.14$) was not significantly lower in *H. pylori*-positive patients. FCSRT was not available for 23 patients because the MMSE score was less than 15 for 8 patients and not available for 15 patients. None of the items was significantly different between the 2 groups according to *H. pylori* status (Table 2).

3.3. *H. pylori* status and gastric atrophy, homocysteine level, and cerebrovascular lesions

The mean Fazekas score was not associated with *H. pylori* positivity ($p = 0.19$), and *H. pylori* infection tended to be associated with higher score of periventricular lesions ($p = 0.09$) and white matter lesions ($p = 0.36$) but without significance. Vascular risk factors (hypertension, tobacco users, LDL-cholesterol, BMI) did not explain this tendency (Table 2). On the other hand, Fazekas score was positively correlated to homocysteine plasmatic levels (Spearman test, $r = 0.34$, $p = 0.032$), and as shown in Figs. 1 and 2, higher levels of homocysteine concentration were associated with *H. pylori* infection via chronic atrophic gastritis (Spearman test, PgI/PgII ratio $r = -0.23$, $p = 0.049$ and *H. pylori* IgG, $r = 0.44$, $p = 0.001$).

3.4. *H. pylori* status and plasma/CSF inflammation markers

The mean plasma fibrinogen concentration tended to be higher in *H. pylori*-positive patients ($p = 0.048$). There was no difference for plasma C-reactive protein (CRP) and plasma cytokines, except the plasma IL-1 β level which was lower in *H. pylori*-positive patients ($p = 0.004$). In CSF, IL-8 ($p = 0.003$) and TNF- α ($p = 0.019$) concentrations were higher in *H. pylori*-positive patients. The mean CSF-neopterin level tended to be higher in *H. pylori*-positive patients without significance ($p = 0.22$).

3.5. Univariate and multivariate analysis

CSF-pTau, -Tau, PgI/PgII ratio, fibrinogen, MMSE score, median age (67 years), plasma IL-1 β , CSF TNF- α , CSF IL-8, and gender were entered in the binary logistic regression model as explanatory variables, with *H. pylori* status as the dependent dichotomous variable. Median age was chosen as cutoff because association was not linear for this explanatory variable. Results showed that *H. pylori*-positive patients had: (1) more atrophic gastric lesions with a significant decrease in PgI/PgII ratio (odds ratio [OR], 0.63 [0.43–0.93], $p = 0.020$); (2) a decreased MMSE score (OR, 0.83 [0.72–0.97], $p = 0.017$); and (3) a decreased IL-1 β plasmatic level (OR, 0.31 [0.11–0.87], $p = 0.025$) (Table 3).

Table 2

Patient's characteristics according to *Helicobacter pylori* status ($n = 53$ patients)

	<i>H. pylori</i> -negative ($n = 33$)	<i>H. pylori</i> -positive ($n = 20$)	<i>p</i> value
Age mean \pm SD, y	66.9 \pm 9.0	70.1 \pm 8.1	0.2
Female gender, n (%)	16 (48)	14 (70)	0.13
ApoE $\epsilon 4$, n (%)	19 (64)	11 (57)	0.82
Dementia data			
MMSE	20.8 \pm 5.1	17.2 \pm 5.6	0.024
FCSRT, mean \pm SD ($n = 20$)			
Immediate recall	10.7 \pm 4.7	11.0 \pm 4.3	0.92
Sum of 3 free recalls	14.4 \pm 13.2	12.1 \pm 9.4	0.57
Sum of the 3 cued recalls	23.8 \pm 12.9	26.2 \pm 15.3	0.70
Delayed free recall	5.0 \pm 5.1	4.3 \pm 4.0	0.75
Delayed cued recall	11.3 \pm 13.4	9.2 \pm 5.2	0.95
FAB, mean \pm SD	11.3 \pm 4.6	8.7 \pm 4.3	0.14
CSF-pTau ₁₈₁ , mean \pm SD pg/mL	86.8 \pm 24.5	120 \pm 52.0	0.014
CSF-Tau, mean \pm SD, pg/mL	618.4 \pm 228.3	999.6 \pm 756.9	0.021
CSF-A β _{1–42} , mean \pm SD, pg/mL	362.2 \pm 100.6	323.9 \pm 101.8	0.20
Vascular data			
Hypertension, n (%)	12 (36)	9 (45)	0.70
Tobacco user, n (%)	8 (24)	3 (15)	0.33
LDL-cholesterol, mean \pm SD, g/L	1.6 \pm 0.5	1.4 \pm 0.6	0.50
BMI, mean \pm SD, Kg/m ²	24.2 \pm 4.4	25.2 \pm 5.4	0.50
Homocysteine, mean \pm SD, μ mol/L	15.0 \pm 4.9	17.2 \pm 6.3	0.16
PgI/PgII ratio, mean \pm SD	7.6 \pm 2.5	5.7 \pm 2.1	0.005
Fazekas score, mean \pm SD	1.14 \pm 1.48	2.00 \pm 2.12	0.19
Inflammatory data			
Plasma-CRP, mean \pm SD, mg/L	2.8 \pm 5.0	3.8 \pm 6.7	0.50
Plasma-fibrinogen, mean \pm SD, g/L	3.4 \pm 0.7	3.8 \pm 0.9	0.048
Plasma-IL-1 β , mean \pm SD, pg/mL	1.4 \pm 1.0	0.62 \pm 0.8	0.004
Plasma-IL-6, mean \pm SD, pg/mL	22.1 \pm 17.9	12.1 \pm 8.8	0.12
Plasma-IL-8, mean \pm SD, pg/mL	51.9 \pm 49.0	50.0 \pm 40.8	0.91
Plasma-TNF- α , mean \pm SD, pg/mL	19.3 \pm 26.6	9.1 \pm 8.1	0.51
CSF-IL-1 β , mean \pm SD, pg/mL	0.22 \pm 0.22	0.15 \pm 0.16	0.19
CSF-IL-6, mean \pm SD, pg/mL	10.2 \pm 8.4	13.2 \pm 23.5	0.50
CSF-IL-8, mean \pm SD, pg/mL	74.9 \pm 40.9	108.4 \pm 124.3	0.003
CSF-TNF- α , mean \pm SD, pg/mL	2.3 \pm 1.9	2.9 \pm 1.3	0.019
CSF-neopterin, mean \pm SD, nmol/L	1.3 \pm 0.3	4.5 \pm 2.0	0.22

Fazekas score (6-point scale) is the sum of periventricular hyperintensity (PVH) graded from 0 to 3, and white matter hyperintensities from 0 to 3.

Key: A β _{1–42}, β amyloid_{1–42}; ApoE $\epsilon 4$, apolipoprotein E allele $\epsilon 4$; BMI, body mass index (calculated as weight [kg]/height [m²]); CRP, C-reactive protein; CSF, cerebrospinal fluid; FAB, frontal assessment battery (18-point scale); FCSRT, Free and Cued Selective Recall Reminding Test; IL, interleukin; LDL, low-density lipoprotein; MMSE, Mini-Mental State Examination (30-point scale); Pg, pepsinogen; pTau₁₈₁, phospho-tau₁₈₁ protein; Tau, total tau protein; SD, standard deviation; TNF- α , tumor necrosis factor α .

4. Discussion

This study explored, for the first time, the association between *H. pylori* infection and AD severity. The strength and originality of this study are based on the strict selection of AD patients, according to NINCDS-ADRDA criteria, completed by CSF biomarkers. Indeed, Tau, pTau₁₈₁, and A β _{1–42} CSF levels, combined with clinical criteria, are known to have high specificity and sensitivity for the diagnosis of AD (Clark et al., 2003).

Our results showed that *H. pylori*-infected patients tended to have more severe dementia as shown by a decreased MMSE and an increased CSF-Tau and -pTau₁₈₁ concentration. Nevertheless, FCRST scores did not confirm these results in 20 evaluated patients. Whereas the CSF Tau level is a marker of neuronal loss, correlation between increased pTau₁₈₁ levels and cognitive decline is still debated. Indeed, CSF-pTau level that increases throughout the cognitive decline has been proposed as a longitudinal

marker of the neurodegenerative process (Andersson et al., 2008). A positive correlation between pTau₁₈₁ levels and AD symptoms has been also observed with a 24-month follow-up (Wallin et al., 2006). Moreover CSF-pTau levels were found to be inversely correlated with hippocampal atrophy on MRI (de Souza et al., 2011). On the other hand, Kester et al. (2009) in a study population of 151 AD patients, found that a low pTau₁₈₁/Tau ratio (i.e., a high Tau in combination with less elevated pTau₁₈₁) and a high Tau/A β _{1–42} ratio were predictors for cognitive decline over time. In our study, we found that Tau/A β _{1–42} ratio was significantly higher among the infected patients, but the pTau₁₈₁/tau ratio was similar between the 2 groups.

Two hypotheses are proposed to explain the association between *H. pylori* infection and cognitive impairment. First, patients with more severe dementia may be more likely to be infected with *H. pylori* due to a lack of hygiene. However, in a 7-year population-based study of subjects older than 65

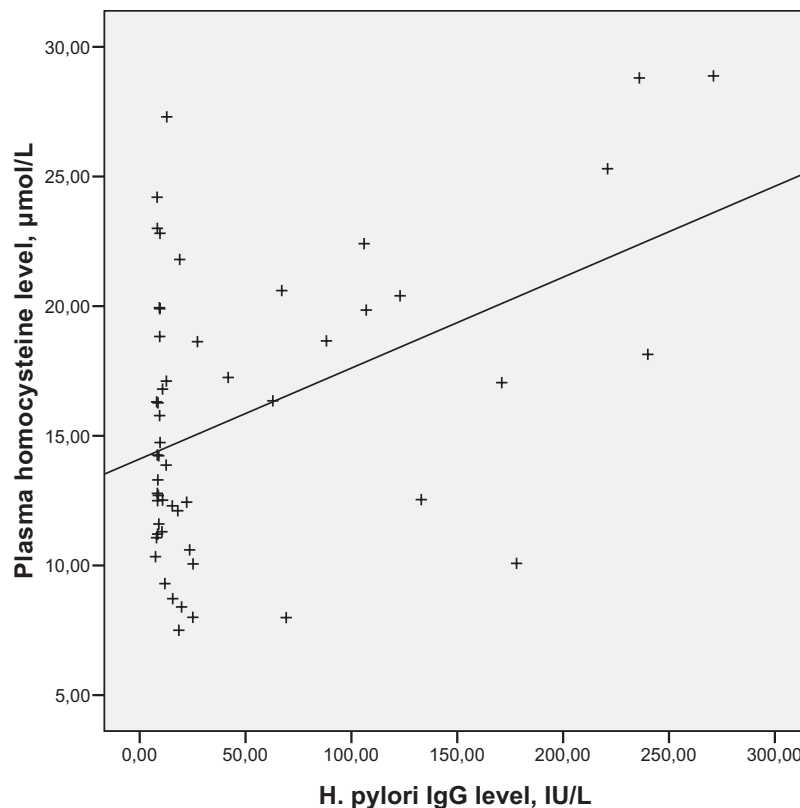


Fig. 1. Correlation between *Helicobacter pylori*-immunoglobulin (Ig)G levels and plasma homocysteine levels; Spearman test, $r = 0.44$, $p = 0.001$.

years, we found that *H. pylori* infection incidence was low (14 new infections among 300 patients; 1.2% per year; Salles et al., 2010), i.e., in the range of what is observed in an adult population (Gisbert, 2005). Second, *H. pylori* infection may amplify neuronal loss either by adding a cerebrovascular component, or by increasing pre-existing neuroinflammation. In fact these preliminary results indicated that *H. pylori* infection may be associated with AD, i.e., more severe cognitive impairment and higher CSF biomarkers of dementia, but we need to go further in order to prove a possible role of chronic *H. pylori* infection in AD physiopathology. *H. pylori* infection evolving over many years could cause a chronic gastric and plasmatic inflammation thus inducing a real “chronic inflammation model” probably responsible for cerebrovascular lesions and exacerbation of neurodegeneration (Holmes et al., 2009; Tan et al., 2007).

Even if several markers reflecting both systemic and central nervous system inflammation tended to be associated with *H. pylori* infection, i.e., increased CSF levels of IL-8 and TNF- α , our results were less conclusive regarding systemic inflammation, i.e., only plasmatic fibrinogen level tended to increase in *H. pylori*-positive patients, whereas IL-1 β decreased. Interpretation of plasmatic and CSF cytokine levels closed to detection thresholds have to be taken precociously, because of their early peak of secretion and short half-life. Although we chose 1 of the best techniques to measure cytokine levels with low detection thresholds,

data interpretation was hazardous especially for IL-1 β and TNF- α . In addition, it can appear difficult to correctly interpret the results of a biological dosage at 1 time in this population most likely infected for many years. Such conflicting results concerning markers of systemic inflammation in previously infected patients have been described in the literature, especially in the context of an association with atherosclerosis (Cherian et al., 2010; Ishida et al., 2008; Oshima et al., 2005).

A large proportion of *H. pylori*-positive patients had antibodies against CagA indicating that these patients were infected with the most proinflammatory *H. pylori* strains. The few CagA-negative cases did not allow us to analyze the results according to CagA status. So we cannot conclude any association between virulent strains and dementia severity.

Concerning the link between chronic *H. pylori* infection and cerebrovascular lesion occurrence, our results showed that *H. pylori*-positive patients tended to have a more pronounced gastric atrophy correlated with higher homocysteine levels and MRI cerebrovascular Fazekas scores. Hyperhomocysteinemia is well recognized as a vascular risk factor (Robinson, 2000) and as an independent risk factor for the development of dementia and AD (Seshadri et al., 2002). Hyperhomocysteinemia can be the consequence of vitamin B12 deficiency following gastric atrophy in *H. pylori*-positive patients (Marino et al., 2007). *H. pylori*

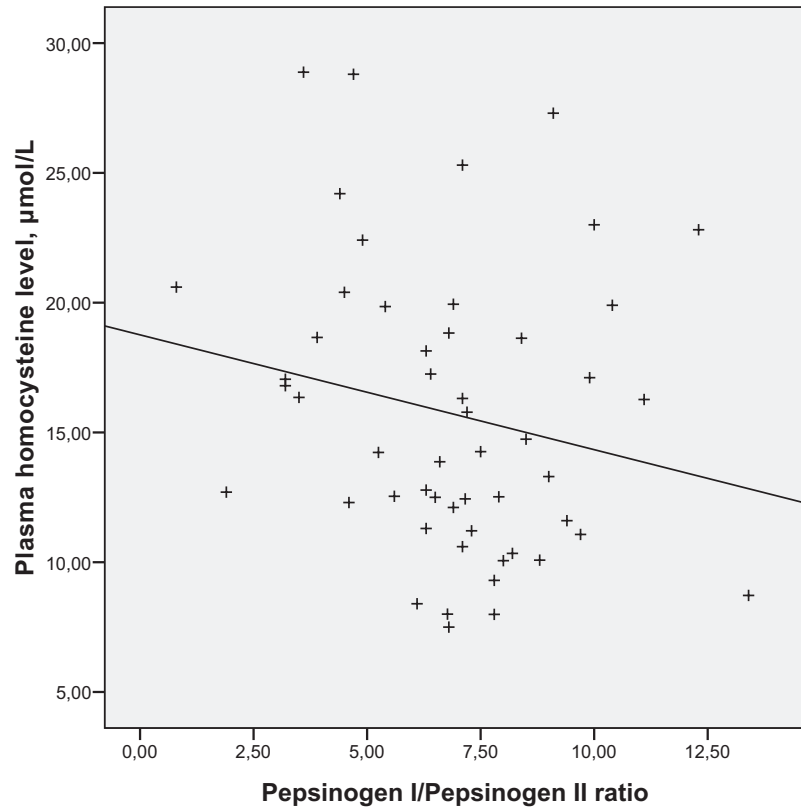


Fig. 2. Correlation between plasma homocysteine level and pepsinogen I/pepsinogen II ratio (Spearman test, $r = -0.23$, $p = 0.049$).

infection may promote atherosclerosis and cerebrovascular lesions, even if the power of the present study was insufficient to demonstrate directly any correlation be-

Table 3

Univariate and multivariate analysis according to *Helicobacter pylori* status ($n = 53$ patients)

Univariate analysis	Odds ratio	95% CI	p value
Age < 67 y	0.38	0.14–1.03	0.058
Female gender	2.5	0.77–8.02	0.13
MMSE	0.88	0.78–0.99	0.031
CSF-pTau ₁₈₁ , pg/mL	1.03	1.01–1.05	0.010
CSF-Tau, pg/mL	1.002	1.001–1.004	0.017
PgI/PgII ratio	0.68	0.51–0.91	0.011
Plasma-fibrinogen, g/L	2.17	0.97–4.88	0.06
Plasma-IL-1 β , pg/mL	0.31	0.12–0.79	0.01
CSF-IL-8, pg/mL	1.005	1.00–1.01	0.21
CSF-TNF- α , pg/mL	1.23	0.88–1.71	0.23
Multivariate analysis	Odds ratio	95% CI	p value
Plasma-IL-1 β , pg/mL	0.31	0.11–0.87	0.025
PgI/PgII ratio	0.63	0.43–0.93	0.020
MMSE	0.83	0.72–0.97	0.017

Univariate and multivariate analysis: binary logistic regression, *H. pylori* status as the dependent dichotomous variable, and age, female gender, MMSE score, CSF-pTau₁₈₁, CSF-Tau, PgI/PgII ratio, plasma-fibrinogen, IL-1 β , CSF-IL-8, and CSF-TNF- α as explanatory variables.

Key: CI, confidence interval; CSF, cerebrospinal fluid; IL, interleukin; MMSE, Mini-Mental State Examination (30-point scale); Pg, pepsinogen; pTau₁₈₁, phospho-tau₁₈₁ protein; Tau, total tau protein; TNF- α , tumor necrosis factor α .

tween cerebrovascular MRI lesion scores and *H. pylori* infection.

Our study has several limitations, such as its retrospective design, and the small number of included patients, and the lack of non-AD dementia or control patients. We have indeed chosen to carefully select patients showing both NINCDS-ADRDA criteria and CSF biomarkers positive for AD, but control patients' CSF and plasma were not available. This AD patient selection did not allow us to conclude about a specific effect of *H. pylori* infection on AD versus other non-AD dementia.

Another limit of our results is the method used to diagnose *H. pylori* infection, i.e., by serum antibody detection, whereas the gold standard consists of gastric-based tests, e.g., histology and culture. However the feasibility of such invasive test was ethically and technically impossible in this population of elderly patients. The value of *H. pylori* serology in the general population has been debated mainly because of the diverse performance of the various tests used and also because of the limits of the tests used as the gold standard to validate this technique. In this study we used a test which ranks among the best with regard to sensitivity and specificity in comparative studies (Fauchère et al., 2011). Nevertheless, performance of *H. pylori* serology on elderly populations remains controversial. As the *H. pylori* antibodies may remain months after *H. pylori* eradication,

serology does not indicate only a current infection but also a past infection (Liston et al., 1996). However, while the infection detected by serology is not detected by other methods, the infection may nevertheless be real as has been shown in the case of atrophy (Kokkola et al., 2000) or antisecretory drug consumption (Salles-Montaudon et al., 2002). Conversely, a risk of underestimation of *H. pylori* diagnosis was also reported especially in malnourished and immunosenescent elderly patients (Salles-Montaudon et al., 2002). Nonetheless serology seems to be an appropriate diagnostic test for elderly populations, because of the high prevalence of gastric atrophy and proton pump inhibitor consumption.

In conclusion, AD patients infected by *H. pylori* present a more marked cognitive impairment and neurodegeneration biomarkers. *H. pylori* infection may probably influence cognitive impairment by increasing neurodegenerative lesions, especially neurofibrillary tangles, and neuronal loss via ischemic lesions. To directly reveal the role of *H. pylori* infection, it will be necessary to determine if *H. pylori* infection induces AD-like cerebral lesions in an animal model of nonpredisposed mice and worsen cerebral lesions in AD predisposed mice; and to evaluate if *H. pylori* eradication improves these lesions.

Disclosure statement

The authors disclose no conflicts of interest.

Written informed consent allowing research, including genetic research, was obtained from each patient participating in the study. The study was approved by the local Ethics Committee (CPP).

Acknowledgements

We thank the “Association de recherches gérontologiques” for its financial support, Neurobiotec for its precious collaboration, especially Nathalie Dufay, Danièle Claudy, and Agnès Sassolas.

References

- Andersson, C., Blennow, K., Almkvist, O., Andreasen, N., Engfeldt, P., Johansson, S.E., Lindau, M., Eriksson-Jönhagen, M., 2008. Increasing CSF phospho-tau levels during cognitive decline and progression to dementia. *Neurobiol. Aging* 29, 1466–1473.
- Backert, S., Selbach, M., 2008. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 10, 1573–1581.
- Balin, B.J., Gérard, H.C., Arking, E.J., Appelt, D.M., Branigan, P.J., Abrams, J.T., Whittum-Hudson, J.A., Hudson, A.P., 1998. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Med. Microbiol. Immunol.* 187, 23–42.
- Cherian, S., Burgner, D.P., Cook, A.G., Sanfilippo, F.M., Forbes, D.A., 2010. Associations between *Helicobacter pylori* infection, co-morbid infections, gastrointestinal symptoms, and circulating cytokines in African children. *Helicobacter* 15, 88–97.
- Clark, C.M., Xie, S., Chittams, J., Ewbank, D., Peskind, E., Galasko, D., Morris, J.C., McKeel, D.W., Jr., Farlow, M., Weitlauf, S.L., Quinn, J., Kaye, J., Knopman, D., Arai, H., Doody, R.S., DeCarli, C., Leight, S., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2003. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch. Neurol.* 60, 1696–1702.
- de Souza, L.C., Chupin, M., Lamari, F., Jadel, C., Leclercq, D., Colliot, O., Lehericy, S., Dubois, B., Sarazin, M., 2011. CSF tau markers are correlated with hippocampal volume in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.02.022.
- Dubois, B., Slachevsky, A., Litvan, I., Pillon, B., 2000. The FAB: a Frontal Assessment Battery at bedside. *Neurology* 55, 1621–1626.
- Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., van Duijn, C.M., 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278(16) 278, 1349–561356.
- Fauchère, J., Charlier-Bret, N., Courillon-Mallet, A., de Korwin, J., Raymond, J., Buruco, C., Mégraud, F., Delchier, 2011. Évaluation comparative de 29 trousses commercialisées pour le diagnostic sérologique de l'infection par *Helicobacter pylori*: étude multicentrique du Groupe d'Etude Français des Helicobacters (GEFH). *Feuilles de Biologie* 2011;298:25–32.
- Fazekas, F., Chawluk, J.B., Alavi, A., Hurtig, H.I., Zimmerman, R.A., 1987. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am. J. Roentgenol.* 149, 351–356.
- Figura, N., Franceschi, F., Santucci, A., Bernardini, G., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A., 2010. Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 15 suppl 1, 60–68.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E., McHugh, P.R., 1975. “Mini-mental state”. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 12, 189–198.
- Fox, N.C., Schott, J.M., 2004. Imaging cerebral atrophy: normal ageing to Alzheimer's disease. *Lancet* 363, 392–394.
- Gisbert, J.P., 2005. The recurrence of *Helicobacter pylori* infection: incidence and variables influencing it. A critical review. *Am. J. Gastroenterol.* 100, 2083–2099.
- Grober, E., Buschke, H., Crystal, H., Bang, S., Dresner, R., 1988. Screening for dementia by memory testing. *Neurology* 38, 900–903.
- Helmer, C., Pasquier, F., Dartigues, J.F., 2006. Epidemiology of Alzheimer disease and related disorders [in French]. *Med Sci (Paris)* 22, 288–296.
- Hixson, J.E., Vernier, D.T., 1990. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J. Lipid Res.* 31, 545–548.
- Holmes, C., Cunningham, C., Zotova, E., Woolford, J., Dean, C., Kerr, S., Culliford, D., Perry, V.H., 2009. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* 73, 768–774.
- Hulstaert, F., Blennow, K., Ivanou, A., Schoonderwaldt, H.C., Riemschneider, M., De Deyn, P.P., Bancher, C., Cras, P., Wiltfang, J., Mehta, P.D., Iqbal, K., Pottel, H., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., 1999. Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1–42) and tau levels in CSF. *Neurology* 52, 1555–1562.
- Ishida, Y., Suzuki, K., Taki, K., Niwa, T., Kurotsuchi, S., Ando, H., Iwase, A., Nishio, K., Wakai, K., Ito, Y., Hamajima, N., 2008. Significant association between *Helicobacter pylori* infection and serum C-reactive protein. *Int. J. Med. Sci.* 5, 224–229.
- Itzhaki, R.F., Lin, W.R., Shang, D., Wilcock, G.K., Faragher, B., Jamieson, G.A., 1997. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 349, 241–244.
- Kester, M.I., van der Vlies, A.E., Blankenstein, M.A., Pijnenburg, Y.A., van Elk, E.J., Scheltens, P., van der Flier, W.M., 2009. CSF biomarkers predict rate of cognitive decline in Alzheimer disease. *Neurology* 73, 1353–1358.
- Kokkola, A., Rautelin, H., Puolakkainen, P., Sipponen, P., Färkkilä, M., Haapiainen, R., Kosunen, T.U., 2000. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in patients with atrophic gastritis: comparison of histology,

- 13C-urea breath test, and serology. *Scand. J. Gastroenterol.* 35, 138–141.
- Kountouras, J., Boziki, M., Gavalas, E., Zavos, C., Grigoriadis, N., Deretzi, G., Tzives, D., Katsinelos, P., Tsolaki, M., Chatzopoulos, D., Venizelos, I., 2009. Eradication of *Helicobacter pylori* may be beneficial in the management of Alzheimer's disease. *J. Neurol.* 256, 758–757.
- Kountouras, J., Tsolaki, M., Gavalas, E., Boziki, M., Zavos, C., Karatzoglou, P., Chatzopoulos, D., Venizelos, I., 2006. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer disease. *Neurology* 66, 938–940.
- Leodolter, A., Vaira, D., Bazzoli, F., Schütze, K., Hirschl, A., Mégraud, F., Malfertheiner, P., 2003. European multicentre validation trial of two new non-invasive tests for the detection of *Helicobacter pylori* antibodies: urine-based ELISA and rapid urine test. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18, 927–931.
- Liston, R., Pitt, M.A., Banerjee, A.K., 1996. IgG ELISA antibodies and detection of *Helicobacter pylori* in elderly patients. *Lancet* 347, 269.
- Loeb, M.B., Molloy, D.W., Smieja, M., Standish, T., Goldsmith, C.H., Mahony, J., Smith, S., Borrie, M., Decoteau, E., Davidson, W., McDougall, A., Gnarp, J., O'Donnell, M., Chernesky, M., 2004. A randomized, controlled trial of doxycycline and rifampin for patients with Alzheimer's disease. *J. Am. Geriatr. Soc.* 52, 381–387.
- Malaguarnera, M., Bella, R., Alagona, G., Ferri, R., Carnemolla, A., Pennisi, G., 2004. *Helicobacter pylori* and Alzheimer's disease: a possible link. *Eur. J. Intern. Med.* 15, 381–386.
- Marino, M.C., de Oliveira, C.A., Rocha, A.M., Rocha, G.A., Clementino, N.C., Antunes, L.F., Oliveira, R.A., Martins, A.S., Del Puerto, H.L., D'Almeida, V., Galdieri, L., Pedroso, E.R., Cabral, M.M., Nogueira, A.M., Queiroz, D.M., 2007. Long-term effect of *Helicobacter pylori* eradication on plasma homocysteine in elderly patients with cobalamin deficiency. *Gut* 56, 469–474.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E.M., 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939–944.
- Miklosy, J., 2008. Chronic inflammation and amyloidogenesis in Alzheimer's disease – role of Spirochetes. *J. Alzheimers Dis.* 13, 381–391.
- Nancey, S., Perret-Liaudet, A., Moussata, D., Graber, I., Boschetti, G., Renaud, B., Kaiserlian, D., Reimund, J.M., Flourié, B., 2008. Urinary neopterin is a valuable tool in monitoring Crohn's disease activity. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 1548–1554.
- Oshima, T., Ozono, R., Yano, Y., Oishi, Y., Teragawa, H., Higashi, Y., Yoshizumi, M., Kambe, M., 2005. Association of *Helicobacter pylori* infection with systemic inflammation and endothelial dysfunction in healthy male subjects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45, 1219–1222.
- Robinson, K., 2000. Homocysteine, B vitamins, and risk of cardiovascular disease. *Heart* 83, 127–130.
- Salles, N., Letenneur, L., Buissonnière, A., Jehanno, A., Dartigues, J.F., Mégraud, F., 2010. Does *Helicobacter pylori* affect life expectancy? *J. Am. Geriatr. Soc.* 58, 1607–1609.
- Salles-Montaudon, N., Dertheil, S., Broutet, N., Gras, N., Monteiro, L., De Mascarel, A., Megraud, F., Emeriau, J.P., 2002. Detecting *Helicobacter pylori* infection in hospitalized frail older patients: the challenge. *J. Am. Geriatr. Soc.* 50, 1674–1680.
- Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W., Wolf, P.A., 2002. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J. Med.* 346, 476–483.
- Shiota, S., Murakami, K., Yoshiiwa, A., Yamamoto, K., Ohno, S., Kuroda, A., Mizukami, K., Hanada, K., Okimoto, T., Kodama, M., Abe, K., Yamaoka, Y., Fujioka, T., 2011. The relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer's disease in Japan. *J. Neurol.* 258, 1460–1463.
- Straus, S.E., Thorpe, K.E., Holroyd-Leduc, J., 2006. How do I perform a lumbar puncture and analyze the results to diagnose bacterial meningitis? *JAMA* 296, 2012–2022.
- Tan, Z.S., Beiser, A.S., Vasan, R.S., Roubenoff, R., Dinarello, C.A., Harris, T.B., Benjamin, E.J., Au, R., Kiel, D.P., Wolf, P.A., Seshadri, S., 2007. Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study. *Neurology* 68, 1902–1908.
- Väänänen, H., Vauhkonen, M., Helske, T., Kääriäinen, I., Rasmussen, M., Tunturi-Hihnal, H., Koskenpato, J., Sotka, M., Turunen, M., Sandström, R., Ristikankare, M., Jussila, A., Sipponen, P., 2003. Non-endoscopic diagnosis of atrophic gastritis with a blood test. Correlation between gastric histology and serum levels of gastrin-17 and pepsinogen I: a multicentre study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 885–891.
- Wallin, A.K., Blennow, K., Andreasen, N., Minthon, L., 2006. CSF biomarkers for Alzheimer's disease: levels of beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 21, 131–138.
- Wozniak, M.A., Itzhaki, R.F., 2010. Antiviral agents in Alzheimer's disease: hope for the future? *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 3, 141–152.

Elsevier Editorial System(tm) for Neurobiology of Aging
Manuscript Draft

Manuscript Number: NBA-12-668

Title: Variable mis-specification on preliminary results

Article Type: Letter to the Editor

Section/Category: Alzheimer's Disease & Other Dementias

Keywords: Alzheimer Disease, Helicobacter pylori, Infection

Corresponding Author: Dr. Victor Cardenas, MD, MPH, PhD,

Corresponding Author's Institution: University of Texas HSC at Houston School of Public Health

First Author: Victor Cardenas, MD, MPH, PhD,

Order of Authors: Victor Cardenas, MD, MPH, PhD,

Manuscript Region of Origin: USA

Abstract:



August 31, 2012

Paul D. Coleman, PhD

Banner Sun Health Research Institute and Center for Neural Development and Disease, University of Rochester Medical Center

Editor-in-Chief

Neurobiology of Aging

Dear Dr. Coleman,

I read with great interest the paper by Roubaud-Baudron *et al.*, titled "Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer disease: preliminary results" (1), which concludes that Alzheimer disease "patients infected by *Helicobacter pylori* tended to be more cognitively impaired." The authors report on a series of 53 AD patients on which CSF measurements of various parameters, including cytokines, apoE genotype, cholesterol, homocysteine, pepsinogens, MRI cerebrovascular staging and neuropsychological testing were available. Roubaud-Baudron *et al.*, found a 3-point difference in the mini-mental status examination (MMSE) and CSF Tau total and Tau-phosphorylated levels. At the same time, however, *H. pylori* positive subjects were also on average three years older, and such age difference could possibly explain the observed small differences in MMSE and Tau levels. One would suspect the potential age-confounding could and should be removed in the analysis using multivariate regression methods. However, the variable that was used by Roubaud-Baudron *et al.* as outcome was not the MMSE or Tau but *H. pylori* infection status. As a result, the odds ratios presented in Table 3 of Roubaud-Baudron *et al.* paper, (OR=0.83) does seem difficult to interpret. It seems that the findings on the differences by Tau total and Tau -phosphorylated were considered non-significant, although the size of the differences was

large. These seem important as longitudinal studies seem to indicate that such CSF biomarkers do not increase significantly with disease progression (2).

It should be obvious that one would like to know if there is a change of the estimate from the crude 3-point difference in MMSE score once you control for age, and hopefully education, and what the adjusted size of the difference by *H. pylori* status is once the model is age adjusted. It does not make sense to think about *H. pylori* infection status as the dependent variable, when one's interest is cognitive impairment and would like to know if there is an impact by *Helicobacter pylori* infection.

Sincerely,

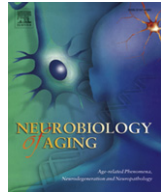
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Victor M. Cardenas', with a stylized, cursive script.

Victor M. Cardenas, MD, MPH, PhD

Associate Professor of Epidemiology

References

1. Roubaud-Baudron C, Krolak-Salmon P, Quadrio I, Mégraud F, Salles N: Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease: preliminary results. *Neurobiol Aging*. 2012; 33: 1009.e11–1009.e19
2. Kester MI, Scheffer PG, Koel-Simmelink MJ, Twaalfhoven H, Verwey NA, Veerhuis R, Twisk JW, Bouwman FH, Blankenstein MA, Scheltens P, Teunissen C, van der Flier WM. Serial CSF sampling in Alzheimer's disease: specific versus non-specific markers. *Neurobiol Aging*. 2012;33:1591-8.



Correspondence

Change of the dependent variable

Dear Editor:

In his comment, Dr Victor Cardenas pointed out the fact that it would be more informative to take mini-mental state examination (MMSE) score as a dependent variable to know if there was an impact by *Helicobacter pylori* infection on cognitive impairment. First of all, we thank Dr Victor Cardenas for this comment that encourages us to approach the problem differently. In fact, our aim was initially to observe what varied between Alzheimer's disease patients regarding their *H. pylori* status, and we found that *H. pylori* infection was associated with a lower MMSE score in a multivariate analysis. As recommended, we used the MMSE score as the dependent variable. A, univariate analysis was performed for several factors: age; gender; presence of the $\epsilon 4$ allele for apolipoprotein E; cardiovascular factors (hypertension, hypercholesterolemia, tobacco consumption, etc.); homocysteine level; pepsinogen I/II ratio; serum and cerebrospinal fluid (CSF); cytokines (interleukin [IL]-1, IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor α); C-reactive protein and fibrinogen levels; CSF total tau, CSF phospho-tau₁₈₁, and CSF amyloid β_{1-42} levels; and Fazekas score (bivariate Spearman correlation test or *t* test when appropriate). Normal distribution was checked for each variable. Factors that achieved a *p* value <0.20 were then entered into the multivariate linear regression model with a backward selection method to obtain a model in which all factors had a *p* value <0.05. To make sure that the "age" factor did not influence the association between *H. pylori* status and the MMSE score in this regression model, it has been entered at each step until the final step. Table 1 resumes the results of the linear regression.

We found that *H. pylori* infection and the presence of the $\epsilon 4$ allele for apolipoprotein E were significantly associated with

a decreased MMSE score with or without age as an explanatory variable. These new results confirm the association between *H. pylori* infection and the severity of the dementia. Nevertheless, we could not exclude confounding factors like educational level that was not available in this study. To further understand this association, experiments on a murine model are in progress to determine if the infection worsens the course of Alzheimer's disease or not. All statistics were performed using SPSS 16.0F for Windows software (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

Claire Roubaud-Baudron*

INSERM U 853, Laboratoire de Bactériologie
University of Bordeaux, and Pôle de gériologie clinique
CHU Hôpitaux de Bordeaux, Bordeaux, France

Xavière Panhard

INSERM UMR 738, Université Paris-Diderot, Paris, France

Pierre Krolak-Salmon

Centre de Mémoire, de Ressource et de Recherche, Hôpital des
Charpennes, Hospices civils de Lyon, University of Lyon
and INSERM U1028, CNRS UMR 5292, Lyon Neuroscience
Research Center, Lyon, France

Isabelle Quadrio

Laboratoire de Neurobiologie
Centre de Biologie et Pathologie Est-GHE Hospices Civils de Lyon
Lyon, France

Francis Mégraud

INSERM U 853, and Laboratoire de Bactériologie
University of Bordeaux, Bordeaux, France

Nathalie Salles

INSERM U 853, Laboratoire de Bactériologie
University of Bordeaux, and Pôle de gériologie clinique
CHU Hôpitaux de Bordeaux, Bordeaux, France

Table 1

Multivariate analysis results according to the MMSE score

	Multivariate analysis	
	Regression slope	<i>p</i> Value
Age	0.068	NS
<i>Helicobacter pylori</i> +	−4.355	0.012
ApoE $\epsilon 4$	−4.415	0.017

Multivariate linear regression: the MMSE score was the dependent variable, and age, female sex, tobacco consumption, *H. pylori* positivity, ApoE $\epsilon 4$, plasma interleukin-8, and cerebrospinal fluid (CSF) phospho-tau₁₈₁ and CSF amyloid β_{1-42} were the explanatory variables.

Key: ApoE $\epsilon 4$, apolipoprotein E allele $\epsilon 4$; MMSE, mini-mental state examination (30-point scale); NS, not significant.

* Corresponding author at: Laboratoire de Bactériologie

University of Bordeaux Segalen, INSERM U853
146 rue Léo Saignat BP 76, 33076 Bordeaux cedex, France
Tel.: +33 5 57 65 66 10; fax: +33 5 57 65 62 24.

E-mail address: claire.roubaud@chu-bordeaux.fr (C. Roubaud-Baudron)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.12.022>

IV. L'INFECTION A *HELICOBACTER* SPP INDUIT-ELLE UNE AMYLOÏDOPATHIE

CEREBRALE ? ETUDE SUR MODELE ANIMAL.

Après avoir réalisé deux études chez l'homme montrant une possible association entre l'infection à *H. pylori* et la maladie d'Alzheimer, nous avons voulu étudier l'impact cérébral de l'infection dans un modèle animal, afin de s'affranchir de facteurs confondants comme le niveau socio-économique. Little *et al.* (175) et Wozniak *et al.* (326) en infectant des souris BALB/c avec *C. pneumoniae* et HSV, respectivement, ont montré que ces deux infections étaient capables d'induire la formation de plaques amyloïdes alors que ces souris n'en développent pas naturellement. A la suite de ces travaux, nous avons voulu étudier l'impact de l'infection chronique à *H. pylori* sur l'apparition de plaques amyloïdes dans le cerveau de souris C57BL6/J non prédisposées à la maladie d'Alzheimer. Comme les souris BALB/c, ces souris ne développent pas naturellement de plaques amyloïdes. Nous avons choisi le fond génétique C57BL6/J, car l'infection à *H. pylori* y induit une gastrite plus importante que chez les souris BALB/c. Nous avons étudié le cerveau de souris infectées durant 18 mois par *H. pylori* ou *H. felis*. *H. pylori* est connu pour être un pathogène de l'homme mais sa capacité à coloniser la muqueuse gastrique de souris est faible, toutefois certaines souches ont été « adaptées » à la souris (par plusieurs cycles d'infection) et sont capables de coloniser et d'induire une inflammation gastrique comme la souche SS1 (167). *H. felis* est rarement responsable d'infection chez l'homme, en revanche il induit une inflammation gastrique très importante chez la souris (306). L'utilisation de ces 2 souches bactériennes paraissait donc intéressante pour leur pertinence clinique d'une part et la certitude d'avoir une inflammation gastrique importante d'autre part.

Après 18 mois d'infection, nous n'avons pas retrouvé de plaques amyloïdes dans le cerveau de ces souris (coloration à la thioflavine S) et la neuroinflammation n'étaient pas plus importante chez les souris infectées que chez les souris non infectées. *H. pylori* n'induit donc pas la formation de plaque amyloïde chez des souris C57BL6/J non prédisposées à la maladie d'Alzheimer.

Ce travail a été soumis pour publication dans *Journal of Alzheimer's Disease* et est en cours de correction.

Article 3. Roubaud Baudron C, Chambonnier L, Giese A, Macrez N, Cho Y, Fénelon V, Blaszczyk L, Dubus P, Mégraud F, Salles N and Varon C. Eighteen months *Helicobacter* infection does not induce amyloid plaque nor neuroinflammation in brains of wild type C57BL/6J mice.

**Eighteen months *Helicobacter* infection does not induce amyloid plaque nor
neuroinflammation in brains of wild type C57BL/6J mice.**

Claire Roubaud Baudron^{a,b,c}, Lucie Chambonnier^{a,b}, Alban Giese^b, Nathalie Macrez^{b,d}, Yoon
Cho^{b,e}, Valérie Fénelon^{b,f}, Lucie Blaszczyk^{b,f}, Pierre Dubus^{b,g}, Francis Mégraud^{a,b}, Nathalie
Salles^{a,b,c} and Christine Varon^{a,b}.

^a INSERM U853, F-33000, Bordeaux, France

^b University of Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France

^c Pôle de gériatrie clinique CHU de Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France

^d CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000, Bordeaux, France

^e CNRS, INCIA, UMR 5287, F-33000, Bordeaux, France

^f INSERM U862 Physiopathologie de la plasticité neuronale, F-33000, Bordeaux, France

^g EA 2406 Histologie et Pathologie, F 33000, Bordeaux France

Running title

No amyloid plaque induced by *Helicobacter* infection

Corresponding author

Claire Roubaud Baudron, MD MSc

claire.roubaud@chu-bordeaux.fr

INSERM U853, 33076 Bordeaux cedex, France.

Université de Bordeaux, Site de Carreire, 33076 Bordeaux cedex, France

Tel : + 33 5 57 65 66 10 Fax : + 33 5 57 65 62 24

Abstract

Background. There is increasing evidence to support the role of infectious agents in the progression of Alzheimer's disease (AD). *Helicobacter pylori* inducing a life-long chronic gastric inflammation may contribute to increase neuroinflammation.

Objective. To evaluate the impact of *H. pylori* infection on the brain of non AD predisposed mice.

Methods. C57BL/6J wild type (WT) mice were infected with *H. pylori* SS1 (n=6) and *Helicobacter felis* (n=6) strains. Six non-infected WT mice were used as negative controls. After 18-month infection, brain neuroinflammation (anti-GFAP and anti-iba1 immunochemistry) and presence of β -amyloid (A β) deposit (thioflavin-S stain and anti A β immunochemistry) were studied. Three APP-PS1 transgenic mice were used as positive controls.

Results. Whereas *H. pylori* SS1 and *H. felis* infection induced a higher gastric inflammation than non-infected mice ($p < 0.001$), no brain A β deposit was noticed in their brain and the infection did not lead to neuroinflammation compared to APP-PS1 positive controls.

Conclusion. *Helicobacter infection* is not associated with an increase in neuroinflammation nor amyloid deposit after 18 months in infected WT mice.

Key words: neuroinflammation, *Helicobacter pylori*, GFAP, iba 1, Alzheimer's disease, thioflavine-S, dementia.

Introduction

After approximately 100 years of intensive research studying pathophysiological mechanisms related to Alzheimer's disease (AD), especially A β peptide and Tau protein deposition, the two AD histological hallmarks, the initial process inducing the disease and ultimately neurodegeneration has not yet been elucidated [1]. The alteration of the blood--brain barrier [2] and the activation of neuroinflammation [3] seem to play an important role in AD neurodegeneration, especially in the decrease of A β clearance [4]. Moreover it has been proven that systemic inflammation worsens brain lesions and behavior in a murine model of AD [5, 6] and is even able to induce β -Amyloid pathology in WT mice when the inflammation starts *in utero* [5]. These data allowed researchers to evoke an infectious hypothesis with several agents like herpes Simplex Virus(HSV), spirochetes or *Chlamydia pneumoniae* [7]. These agents have been incriminated in AD pathophysiology because they were detected in AD human brain specimens [8-10] or because they induced an increased production of A β peptide [11, 12] when co-cultured with neuronal cells and finally induced A β peptide deposit in the mouse brain [13, 14]. Nevertheless, these preliminary results remain controversial because other research teams have not reproduced them. More recently an association between *Helicobacter pylori* infection and AD has been observed in epidemiological studies; two case control studies found a higher prevalence of *H. pylori* infection in AD patients compared to controls [15, 16], and a third study showed that *H. pylori*-positive AD patients presented a more severe cognitive decline compared to non-infected AD patients [17]. Finally recent data shows that *H. pylori* infection could increase the incidence of dementia [18]. In fact, *H. pylori* infection, most often acquired during childhood, induces a lifelong gastric inflammation and remains asymptomatic in 90% of cases [19]. This lifelong gastric inflammation may be implicated in extradigestive diseases

[20] via systemic inflammation and atherosclerosis. AD and *H. pylori* infection share several risk factors like living conditions or education levels, restricting conclusions of epidemiological studies. To bypass these limitations, we studied the impact of chronic *H. pylori* infection on brain histopathology of WT non-AD predisposed mice, like Wozniak *et al.* [14] and Little *et al.* [13] did previously for HSV and *Chlamydia pneumonia*, respectively.

Materials and Methods

Infection of mice with Helicobacter species

All animal experiments were performed in level 2 animal facilities at the University of Bordeaux according to institutional guidelines defined by the local Ethical Committee of the University of Bordeaux and in conformity with the French Ministry of Agriculture Guidelines on Animal Care and the French Committee of Genetic Engineering (approval number 4608).

For mice infection, *H. pylori* SS1 and *H. felis* CS1 strains (kindly provided by A. Labigne, Pasteur Institute, Paris, France) were cultured as previously described [21]. Then 10-week-old C57BL/6j females free of pathogenic agents including *Helicobacter* species (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were infected by oral gavage with the bacterial suspension (SS1 *H. pylori* SS1i, n=6, and *H. felis* CS1, n=6) as described previously [21, 22]. Non-infected mice (control group, n=6) were given phosphate buffered saline (PBS) alone. Mice were housed five per microisolator cage on ventilated shelves on a 12-hour day/night cycle with constant humidity and temperature control, with a low content vitamin diet and water *ad libidum*. The successful infection, as well as absence of infection in the non-infected controls, were confirmed by polymerase chain reaction (PCR) with primers targeting the 16S rDNA from the *Helicobacter* genus and sequencing performed on DNA extracted from aseptically collected stomachs as previously described [21, 22].

As positive controls for neuroinflammation and amyloid deposition, 3 APP-PS1mouse (Tg 2576-PSEN1dE9, 6 months of age) brains were used.

Tissue processing

After an 18-month infection, mice were euthanized by cervical dislocation. The stomach and brain were removed and fixed for 24 h in a solution of 3.7 % neutral-buffered formalin or 4% paraformaldehyde with 0.01% glutaraldehyde (all from Sigma Aldrich, Saint Louis, MI, USA) respectively, followed by standard histological processing and paraffin embedding.

Histological and Immunohistochemical staining

Sections of 3 μ m thickness from paraffin-embedded stomachs were processed for hematoxylin/eosin/safran (HES) staining following the standard procedure. Five μ m brain sections were deparaffinized, rehydrated and stained with 1% Thioflavin-S (Sigma Aldrich) for 8 min then washed with Tris buffered saline (TBS) (2 times 15 min) and 50% ethanol solution (2 times 15 min), then mounted with Vectashield anti-fade mounting medium (Vector Laboratories, Peterborough, UK). For immunohistochemistry detection, 5 μ m sections from paraffin-embedded brains were rehydrated, washed and heated to 100°C for 30 min for antigen retrieval using a homemade buffer, Tris ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA 1mM), pH9, then 30 min at room temperature (RT). After washing in TBS (3 times 10 min), endogenous peroxidases were inhibited with 3% hydrogen peroxide in H₂O for 5 min. Sections were blocked for 30 min in a solution of bovine serum albumin (BSA, 1%) with goat serum (10%) in TBS (Sigma Aldrich). Slides were then incubated for 3 h at RT with primary rabbit anti-GFAP antibodies (1:2000) (Dako, Trappes, France) or anti-iba 1 antibodies (1:1000) (Wako, Osaka, Japan) or anti A β (Invitrogen, Saint Aubin, France) for detection of astroglia, microglia and amyloid deposition, respectively, followed by a 30 min incubation at RT with labeled polymer-HRP anti-rabbit antibodies (DAKO Envision Systems, Dako), washed with TBS and revealed by an additional 10 min incubation with Liquid DAB Substrate-

Chromogen System (DAKO) at RT. Slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted with Eukitt-mounting medium (Labonord, Pessac, France).

Quantification scoring and statistical analysis

Gastric histology was scored blindly using a numerical scale of 1 to 4 for quantification of inflammation as previously described [21]. Hippocampal and cortical GFAP-positive astrocyte and iba1-positive microglial cell counts and areas were determined automatically by Mercator software (Explora Nova, Mercator, La Rochelle, France) on two consecutive coronal sections localized approximately 1.8 mm behind the bregma when scanned by Panoramic viewer 1.15 (3D Histech, Budapest, Hungary) [23]. The threshold of detection was held constant during analysis and all measurements were conducted in a blinded fashion. Thioflavine-S slide scanning was performed using a fluorescence-based microscope scanning system, Metafer VSlide (MetaSystems, Altlussheim, Germany). Quantitative results were expressed as a mean \pm standard deviation and infected, non-infected and APP-PS1 groups were compared using a one way ANOVA followed by a post hoc Tukey's test. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Gastric inflammation

The successful infection, as well as the absence of infection in the non-infected controls, were confirmed for all of the mice by *Helicobacter* genotyping (data not shown). *H. pylori* and *H. felis* infections were associated with an increased gastric inflammation (mean inflammation score, 1.3 ± 0.61 in controls versus 2.8 ± 0.98 with *H. pylori* SS1 strain and 3.2 ± 0.41 with *H. felis*, $p < 0.001$).

Amyloid deposition

No amyloid plaque was detected in C57BL/6j mice after 18 months of infection, whether *H. pylori* SS1 or *H. felis*, nor in non-infected negative controls, whereas amyloid deposition was present in positive control APP-PS1 mice with Thioflavin-S stain (**Figure 1**) or anti A β immunostaining (data not shown).

Neuroinflammation

The GFAP-positive astrocyte count and area were not significantly different between control and infected WT mice. APP-PS1 mice presented a higher number and a larger area occupied by GFAP-positive astrocytes than WT mice (**Figure 2 a, b**). Iba1-positive microglial cell count and area were also increased in APP-PS1 mice compared to WT mice, moreover no difference was observed between infected and non-infected WT mice (**Figure 3 a, b**).

Discussion

Unlike previous studies with HSV or *C. pneumoniae*, this study failed to show an induction of AD-like lesions in the brain of non-predisposed mice after an 18-month period *H. pylori* infection. In fact, Little *et al.* [13] obtained amyloid plaques with astroglial activation in the brain of non-transgenic BALB/c mice following a 3-month infection with *C. pneumoniae* isolated from the brain of an AD patient post-mortem, and Wozniak *et al.* [14] found deposition of A β ₁₋₄₂ on brain sections from a BALB/c mice 5 days after HSV1 infection, using a strain isolated from a patient with a herpes simplex encephalitis. In both studies, the infectious agent was isolated from a human brain. But, recently, Eisele *et al.* [24] showed that the intraperitoneal administration of β -Amyloid Precursor Protein (β APP)-transgenic mice (Tg) brain extract into young β APP-Tg mice triggered cerebral amyloid deposit after 7 months whereas intraperitoneal inoculation with phosphate-buffered saline (PBS) or brain extract from age-matched, non-tg wild-type mice was ineffective. Perhaps HSV and *C. pneumoniae* isolated from humans were associated with the presence of A β peptides which may have behaved like a prion protein in recipient mice. To our knowledge, results of these 2 studies were not able to be reproduced by others despite several attempts; Boelen *et al.* did not observe any amyloid plaques in 3-month *C. pneumoniae* infected WT BALB/c mice [25] and Guzman-Sanchez *et al.* [26] concluded that the presence of HSV-1 (16 months post-infection) did not directly cause any significant neurodegeneration in the brain of C57BL/6J mice.

H. pylori is responsible for asymptomatic gastritis in 90% of the cases. The consequences of its low grade but lifelong inflammation have been implicated in several extradigestive diseases but remain controversial [20]. In contrast to HSV or *C. pneumoniae*, *H. pylori* cerebral tropism is not very likely, despite the fact that its DNA was found in extragastric

locations, like atherosclerotic plaques [27]. Several hypotheses have been suggested to explain the association between *H. pylori* and extradigestive diseases like the effect of the systemic inflammation induced by the infection or autoimmune processes mediated by molecular mimicry [28]. Our results do not support the hypothesis that gastric inflammation induced by *H. pylori* infection triggers activation of neuroinflammation in this non-Tg mouse model. The neuroinflammation is described in this study with the number and the area occupied by astroglial and microglial cells, the increase of these two data is an indirect but a well-accepted sign of activation [29, 30].

The choice of C57Bl6 mice (rather than BALB/c background) was based on their ability to develop a stronger Th1 immune response to *Helicobacter* infection than BALB/c mice. This Th1 immune response enhanced gastritis induced by *Helicobacters* [32] and increased the probability of a systemic inflammation as similar to that is observed in humans. *H. felis* was also chosen even though it is not a usual pathogen in humans because it is a strong gastric inflammation inducer in mice [33].

Further studies on the impact of *H. pylori* infection on AD predisposed mice should produce interesting results. In fact, *H. pylori* infection does not induce amyloid deposition nor does it increase neuroinflammation at this stage in WT mice, but we cannot exclude that these phenomena could be worsened by the infection if the AD pathology is already in progress.

Acknowledgments including sources of support

CR was a recipient of a fellowship from the French Alzheimer Plan. LB was a recipient of a studentship from the French Ministry for Research. We thank B. Rousseau for technical assistance in mice experiments. Alban Giese and the Experimental Histology Unit were funded by the Cancéropole Grand Sud Ouest.

Conflict of interest: none

References

- [1] Lansbury PT, Lashuel HA (2006) A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature* **443**, 774-779.
- [2] Zlokovic BV (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**, 178-201.
- [3] Griffin WS, Barger SW (2010) Neuroinflammatory Cytokines-The Common Thread in Alzheimer's Pathogenesis. *US neurol* **6**, 19-27.
- [4] Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* **330**, 1774.
- [5] Krstic D, Madhusudan A, Doehner J, Vogel P, Notter T, Imhof C, Manalastas A, Hilfiker M, Pfister S, Schwerdel C, Riether C, Meyer U, Knuesel I (2012) Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *J Neuroinflammation* **9**, 151.
- [6] Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM (2005) Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **25**, 8843-8853.
- [7] Miklossy J (2011) Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med* **13**, e30.
- [8] Gerard HC, Dreses-Werringloer U, Wildt KS, Deka S, Oszust C, Balin BJ, Frey WH, 2nd, Bordayo EZ, Whittum-Hudson JA, Hudson AP (2006) *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *FEMS Immunol Med Microbiol* **48**, 355-366.

- [9] Miklossy J (1993) Alzheimer's disease--a spirochetosis? *Neuroreport* **4**, 1069.
- [10] Wozniak MA, Mee AP, Itzhaki RF (2009) Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J Pathol* **217**, 131-138.
- [11] Miklossy J, Kis A, Radenovic A, Miller L, Forro L, Martins R, Reiss K, Darbinian N, Darekar P, Mihaly L, Khalili K (2006) Beta-amyloid deposition and Alzheimer's type changes induced by *Borrelia* spirochetes. *Neurobiol Aging* **27**, 228-236.
- [12] Piacentini R, Civitelli L, Ripoli C, Marcocci ME, De Chiara G, Garaci E, Azzena GB, Palamara AT, Grassi C (2011) HSV-1 promotes Ca²⁺ -mediated APP phosphorylation and Aβ accumulation in rat cortical neurons. *Neurobiol Aging* **32**, 2323 e2313-2326.
- [13] Little CS, Hammond CJ, MacIntyre A, Balin BJ, Appelt DM (2004) *Chlamydia pneumoniae* induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice. *Neurobiol Aging* **25**, 419-429.
- [14] Wozniak MA, Itzhaki RF, Shipley SJ, Dobson CB (2007) Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation. *Neurosci Lett* **429**, 95-100.
- [15] Kountouras J, Tsolaki M, Gavalas E, Boziki M, Zavos C, Karatzoglou P, Chatzopoulos D, Venizelos I (2006) Relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer disease. *Neurology* **66**, 938-940.
- [16] Malaguarnera M, Bella R, Alagona G, Ferri R, Carnemolla A, Pennisi G (2004) *Helicobacter pylori* and Alzheimer's disease: a possible link. *Eur J Intern Med* **15**, 381-386.

- [17] Roubaud-Baudron C, Krolak-Salmon P, Quadrio I, Megraud F, Salles N (2012) Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease: preliminary results. *Neurobiol Aging* **33**, 1009 e1011-1009.
- [18] Roubaud Baudron C, Letenneur L, Langlais A, Buissonniere A, Megraud F, Dartigues JF, Salles N (2013) Does *Helicobacter pylori* infection increase incidence of dementia? The Personnes Agees QUID Study. *J Am Geriatr Soc* **61**, 74-78.
- [19] Suerbaum S, Michetti P (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* **347**, 1175-1186.
- [20] Roubaud Baudron C, Franceschi F, Salles N, Gasbarrini A (2013) Extragastric diseases and *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **18 Suppl 1**, 44-51.
- [21] Varon C, Dubus P, Mazurier F, Asencio C, Chambonnier L, Ferrand J, Giese A, Senant-Dugot N, Carlotti M, Mégraud F (2012) *Helicobacter pylori* infection recruits bone marrow-derived cells that participate in gastric preneoplasia in mice. *Gastroenterology* **142**, 281-291.
- [22] Fox JG, Rogers AB, Whary MT, Ge Z, Ohtani M, Jones EK, Wang TC (2007) Accelerated progression of gastritis to dysplasia in the pyloric antrum of TFF2 -/- C57BL6 x Sv129 *Helicobacter pylori*-infected mice. *Am J Pathol* **171**, 1520-1528.
- [23] Paxinos G, Franklin K (2001) the mouse brain in stereotaxic coordinates *Academic Press*.
- [24] Eisele YS, Obermuller U, Heilbronner G, Baumann F, Kaeser SA, Wolburg H, Walker LC, Staufenbiel M, Heikenwalder M, Jucker M (2010) Peripherally applied Abeta-containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis. *Science* **330**, 980-982.
- [25] Boelen E, Stassen FR, van der Ven AJ, Lemmens MA, Steinbusch HP, Bruggeman CA, Schmitz C, Steinbusch HW (2007) Detection of amyloid beta aggregates in the brain

- of BALB/c mice after *Chlamydia pneumoniae* infection. *Acta Neuropathol* **114**, 255-261.
- [26] Guzman-Sanchez F, Valdivieso F, Burgos JS (2012) Aging-related neurostructural, neuropathological, and behavioral changes associated with herpes simplex virus type 1 brain infection in mice. *J Alzheimers Dis* **30**, 779-790.
- [27] Ameriso SF, Fridman EA, Leiguarda RC, Sevlever GE (2001) Detection of *Helicobacter pylori* in human carotid atherosclerotic plaques. *Stroke* **32**, 385-391.
- [28] Kountouras J, Zavos C, Gavalas E, Boziki M, Chatzopoulos D, Katsinelos P (2007) Normal-tension glaucoma and Alzheimer's disease: *Helicobacter pylori* as a possible common underlying risk factor. *Med hypotheses* **68**, 228-229.
- [29] Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**, 7-35.
- [30] Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B (2005) Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Rev* **48**, 196-206.
- [31] Zhang W, Bai M, Xi Y, Hao J, Zhang Z, Su C, Lei G, Miao J, Li Z (2012) Multiple inflammatory pathways are involved in the development and progression of cognitive deficits in APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiol Aging* **33**, 2661-2677.
- [32] Mohammadi M, Nedrud J, Redline R, Lycke N, Czinn SJ (1997) Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology* **113**, 1848-1857.
- [33] Fox JG, Blanco M, Murphy JC, Taylor NS, Lee A, Kabok Z, Pappo J (1993) Local and systemic immune responses in murine *Helicobacter felis* active chronic gastritis. *Infect Immun* **61**, 2309-2315.

Figure Legends

Figure 1. Brain histological results. Amyloid deposition. Coronal hemibrain sections from APP-PS1 (A), control (B), *H. pylori* SS1 (C) and *H. felis* (D) infected mice after thioflavine-S staining.

Figure 2. GFAP-positive astrocyte area (percentage of area occupied by GFAP-positive astrocytes) and count (number of GFAP-positive astrocyte/mm²) in the hippocampus (a) and the cortex with cortical sections from APP-PS1 (A), control (B), *H. pylori* SS1 (C) and *H. felis* (D) infected mice after anti-GFAP immunocytochemistry (b). *p<0.001

Figure 3. Iba 1-positive microglial cell area (percentage of area occupied by GFAP-positive astrocytes) and count (number of GFAP-positive astrocyte/mm²) in the hippocampus (a) and the cortex with cortical sections from APP-PS1 (A), control (B), *H. pylori* SS1 (C) and *H. felis* (D) infected mice after anti-iba1 immunocytochemistry (b). *p<0.001

Figure 1

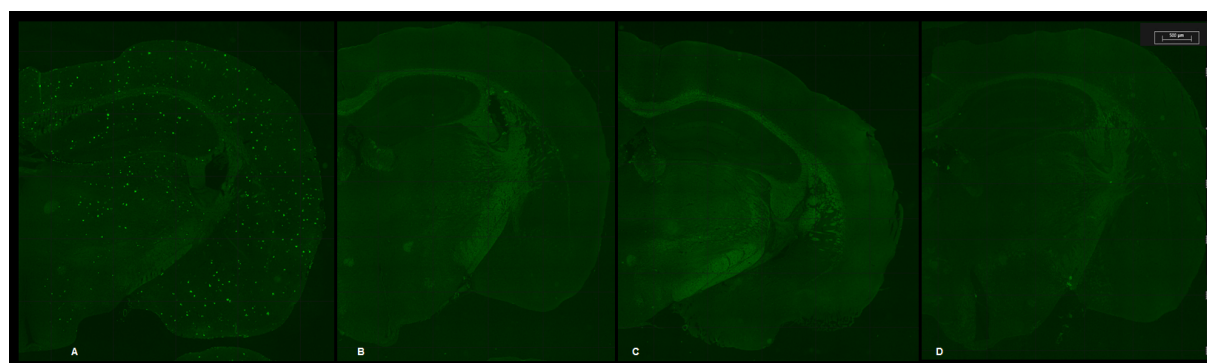
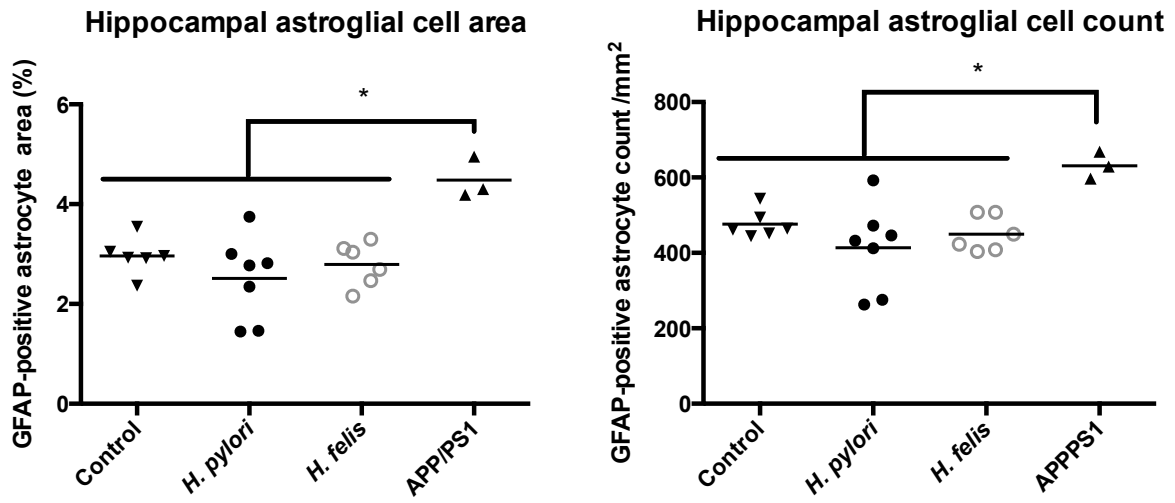
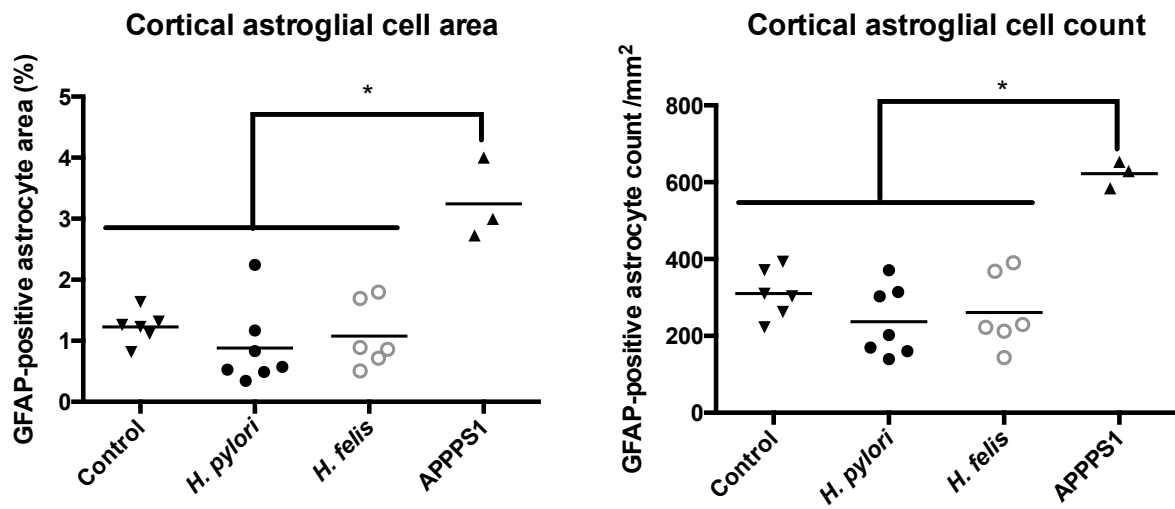


Figure 2

a – Hippocampal GFAP-positives astrocytes



b – Cortical GFAP-positive astrocytes



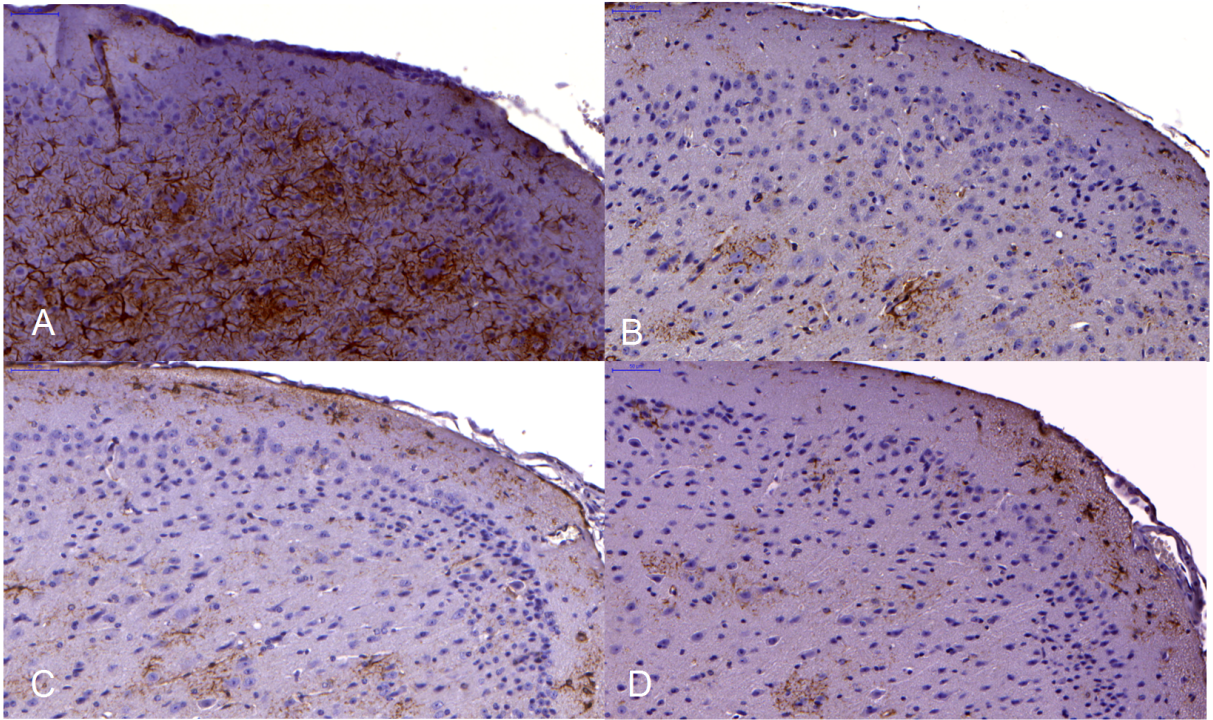
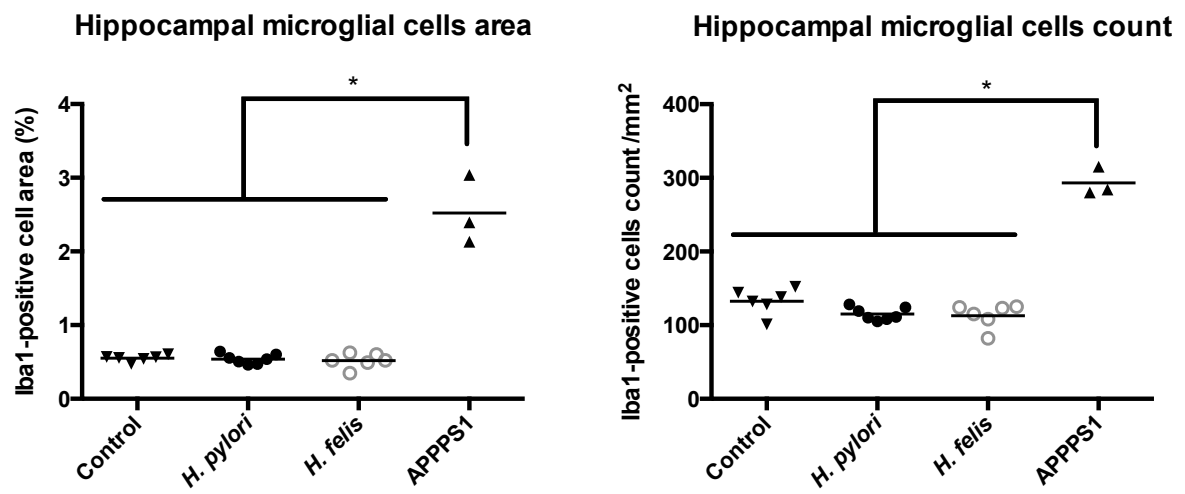
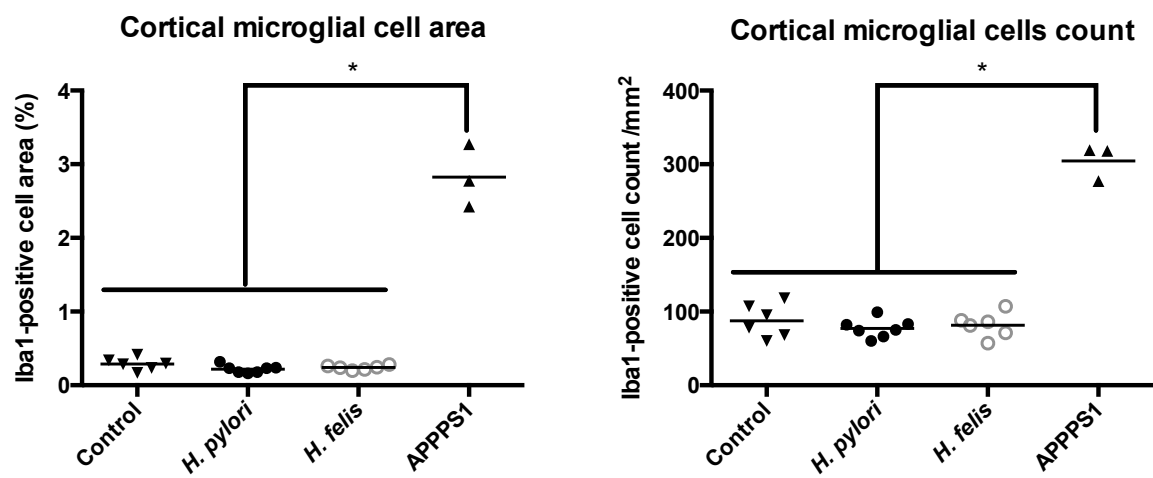


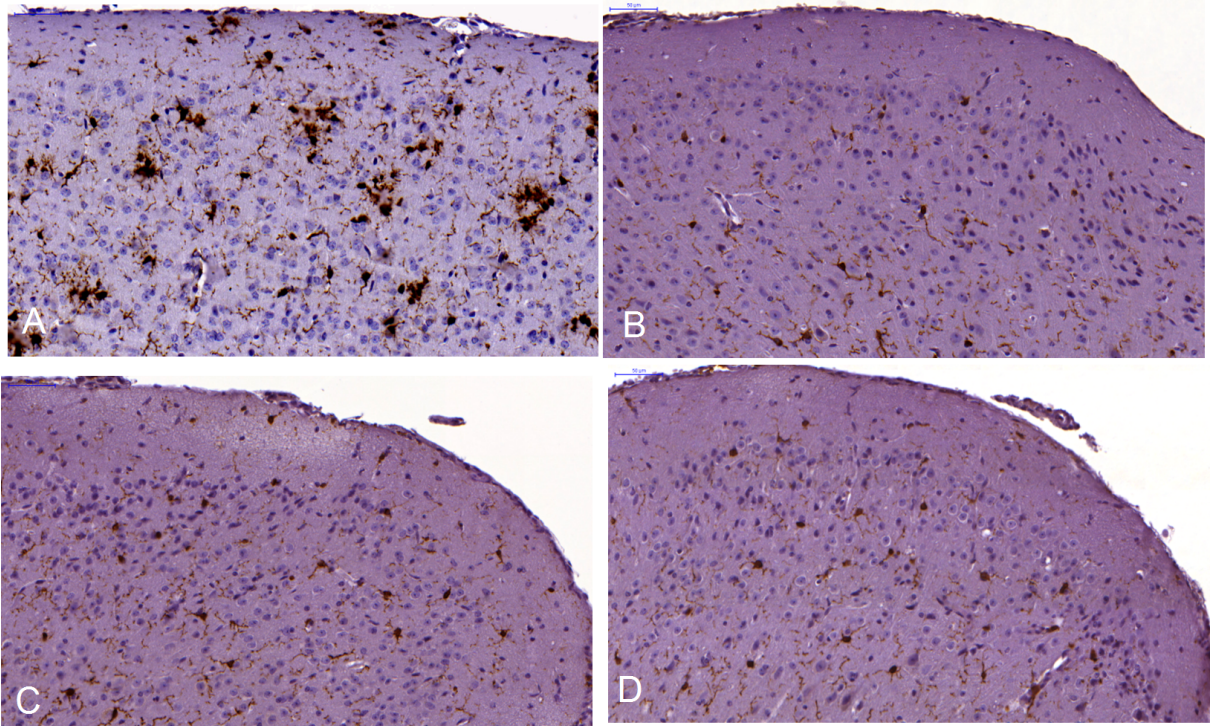
Figure 3

a – Hippocampal iba1-positives microglial cells



b – Cortical iba1-positive microglial cells





V. L'INFECTION A *HELICOBACTER* SPP AGGRAVE-T-ELLE LES TROUBLES DU COMPORTEMENT ET LES LESIONS CEREBRALES DE SOURIS TRANSGENIQUES PREDISPOSEES A LA MALADIE D'ALZHEIMER ?

Devant l'absence d'induction de plaque amyloïde par *H. pylori*, l'étape suivante de notre raisonnement était de savoir si l'infection pouvait aggraver le comportement et les lésions histologiques de souris prédisposées à la maladie d'Alzheimer.

Il existe de nombreux modèles de souris transgéniques capables de reproduire les lésions histopathologiques de la maladie d'Alzheimer en particulier les plaques amyloïdes. Ces souris ont été génétiquement modifiées par l'incorporation de gènes humains mutés responsables des formes familiales de la maladie (APP et préséniline). D'autres modèles sont également capables de développer des dégénérescences neurofibrillaires après l'incorporation du gène d'une protéine tau humaine (72). Nous avons choisi de travailler sur un modèle portant une double mutation : la mutation suédoise de l'APP (APP^{swe}) et une mutation (délétion) de la préséniline PS1dE9. Les modèles de souris qui possèdent ces deux mutations présentent des plaques amyloïdes plus précocement (139) que les souris porteuses d'une seule mutation.

Nous avons infecté ces souris avec *H. felis* et *H. pylori* et étudié leur comportement ainsi que leurs lésions cérébrales (amyloïdopathie et neuroinflammation) à 4, 6 et 10 mois.

Alors qu'un plus grand nombre de plaques amyloïdes a été retrouvé chez les souris infectées par *H. pylori* dès 6 mois, cette augmentation n'était pas associée à un déficit cognitif plus important ou une neuroinflammation augmentée.

Les deux principales difficultés que nous avons rencontrées ont été la réalisation des tests cognitifs dans une animalerie de confinement A2 et la quantification des anomalies histologiques.

L'utilisation d'une animalerie de confinement A2 était nécessaire car nous avons infecté les souris avec *H. pylori* classé selon l'OMS comme un pathogène carcinogène de classe I, de plus, l'objectif principal de notre travail était d'étudier l'impact spécifique de l'infection sur le comportement et les lésions histologiques. Pour cela, les souris étudiées devaient être exemptes d'organisme pathogène spécifique (EOPS) y compris les espèces du genre *Helicobacter*. Pour maintenir cet état sanitaire des souris, des conditions strictes sont nécessaires : portoirs ventilés, stérilisation de la nourriture, du matériel importé dans

l'animalerie, port de combinaisons, masques et gants... les manipulations d'animaux se font sous un poste de sécurité microbiologique (PSM). Nous avons donc du adapter les tests comportementaux à ces conditions. Nous avons choisi de réaliser 4 tests : le labyrinthe en Y teste la mémoire hippocampique (264), le « open field » teste l'anxiété et la locomotion des souris (41), la reconnaissance d'un objet déplacé évalue la mémoire visuelle (41) et enfin l'interaction sociale apprécie la capacité de la souris à s'intéresser à d'autres souris et semble altérée de manière précoce chez les souris transgéniques porteuses de la double mutation APP^{swe} et PS1^{dE9} (244). Ces tests ont donc été réalisés dans des conditions particulières dont on doit tenir compte pour leur interprétation.

La deuxième difficulté rencontrée lors de cette étude était la quantification des résultats histologiques. En effet, bien que les techniques d'histologie aient été réalisées dans les mêmes conditions, il existait des différences de marquage. Pour pallier à ces difficultés, nous avons utilisé un logiciel de quantification spécifique de l'immunohistochimie avec la réalisation d'un seuillage le plus comparable possible entre les coupes. Nous avons également complété ces résultats par la quantification de l'expression de gènes par PCR en quantifiant les ARN messagers.

Ce travail a permis d'étudier l'impact cognitif et histopathologique de l'infection sur un modèle animal de maladie d'Alzheimer mais les résultats obtenus ne permettent pas de conclure à l'absence ou à la présence d'une association de manière définitive.

Ce travail n'a pas encore été soumis pour publication. Certaines données doivent encore être complétées. Nous avons toutefois choisi de présenter les résultats sous la forme d'un article.

Article 4. Does *Helicobacter pylori* infection impact Alzheimer's disease course? An animal study. Roubaud Baudron C, blaszczyk L, Varon C, Chambonnier L, Giese A, Macrez N, Pietropaolo S, Leste-Lasserre T, Costet P, Rousseau B, Fénelon V, Cho Y, Mégraud F and Salles N

Does *Helicobacter pylori* infection impact the course of Alzheimer's disease? An animal study

Claire ROUBAUD BAUDRON^{a,b,c}, Lucie BLASZCZYK^{b,d}, Christine VARON^{a,b}, Lucie CHAMBONNIER^{a,b}, Alban GIESE^{b,e}, Pierre DUBUS^{b,e}, Nathalie MACREZ^{b,f}, Susanna PIETROPAOLO^{b,g}, Thierry LESTE-LASSERRE^{b,d}, Pierre COSTET^h, Benoit ROUSSEAUⁱ, Valérie FENELON^{b,d}, Yoon CHO^{b,g}, Francis MEGRAUD^{a,b} and Nathalie SALLES^{a,b,c}

^a INSERM U853, F-33000, Bordeaux France

^b University of Bordeaux, F-33000, Bordeaux France

^c Pôle de gériatrie clinique, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

^d INSERM U862, F-33000 Bordeaux, France

^e EA 2406, F 33000 Bordeaux France

^f CNRS, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

^g CNRS, UMR 5287, F-33000 Bordeaux France

^h Animalerie spécialisée, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

ⁱ Animalerie A2, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

Corresponding author

Claire ROUBAUD BAUDRON, MD MSc

claire.roubaud@chu-bordeaux.fr

INSERM U853, 33076 Bordeaux cedex, France.

Université de Bordeaux, Site de Carreire, 33076 Bordeaux cedex, France

Tel: + 33 5 57 65 65 53 Fax: + 33 5 57 65 62 24

Background. *Helicobacter pylori* infection seems to play a critical role in extra-gastric diseases including Alzheimer's dementia (AD). Chronic *H. pylori* infection could worsen AD lesions *via* atherosclerosis and inflammation.

Objective. To determine the impact of *Helicobacter* species infection on cerebral lesions and the behaviour of AD transgenic (Tg) mice and their wild type (WT) littermates. .

Methods. Tg mice (APPswe/PS1dE9) and their WT littermates were infected with *H. pylori* (n=60) or *Helicobacter felis* (n=60) or left uninfected (n=60). Cognitive performances (Y-maze, open field, novel object location and direct social interaction) and histological abnormalities were evaluated at 4, 6 and 10 months of age. Brain specimens were processed to detect cerebral amyloid plaques (thioflavin-S stain) and astroglial and microglial cells (immunohistochemistry anti-GFAP and anti-iba-1, respectively). Stomach specimens were processed to detect gastric lesions (hematoxylin and eosin stain). The levels of expression of several genes involved in neuroinflammation (especially gfap and iba-1) were evaluated by quantitative polymerase chain reaction (q-PCR).

Results. *H. pylori* did not lead to any histological or behavioural consequences at 4 months of age, however, at 6 months of age, it was associated with an increased number of amyloid plaques in Tg mice but without changes in behaviours. At 10 months of age, Tg mice showed impaired cognitive and social behaviour with a higher neuroinflammation (immunohistochemistry and q-PCR) than WT littermates.

Conclusion. *H. pylori* infection was associated with an increased number of brain amyloid plaques, but not with increased neuroinflammation nor a worsening behaviour at 6 and 10 months of age. More studies are needed to conclude that there is an association between *H. pylori* infection and AD.

Key words: neuroinflammation, *Helicobacter pylori*, GFAP, iba-1, Alzheimer's disease, thioflavin-S, dementia, transgenic mice, APPswe-PS1dE9, social behavior, cognition

Introduction

Despite a great amount of investigation to try and explain Alzheimer's disease (AD) pathophysiology, the cause of this neurodegenerative disease is still unknown and current treatments are disappointing. The main hypothesis is the development of an amyloid cascade (1, 2) in which an accumulation of amyloid β -peptide (A β) drives AD pathogenesis. The inflammatory hypothesis rests on the influence of microglial and astroglial cells in the A β clearance (3) which seems to decrease and explains the A β accumulation (4) and the secretion of deleterious cytokines (5). The vascular hypothesis is based on epidemiological studies which report that cardiovascular risk factors (6) increase the incidence of AD. The predominant role of the blood brain barrier is also studied (7). Alois Alzheimer already suggested that an infectious agent could be associated with the neurodegenerative disease he described (8). Thus, the link between AD and several infectious agents has been proposed, especially Herpes Simplex Virus (HSV), *Chlamydia pneumonia* and spirochetes based on epidemiological (9-18) and experimental (19-24) studies. Systemic inflammation, regardless of its aetiology, has also been described as a mechanism increasing cognitive decline (25). More recently, an association with *Helicobacter pylori* has also been considered. This infection is acquired during childhood and often persists during an entire lifetime inducing chronic gastric inflammation. This gastritis remains asymptomatic in approximately 80% of the cases and represents a chronic inflammatory model (26). *Via* Increasing systemic inflammation and homocysteine levels, *H. pylori* infection may contribute to worsen AD lesions. Case-control (27, 28) and cohort studies (29-33) found that *H. pylori* infection is more prevalent among AD patients than non-AD patients and increases the risk of developing AD. More recently, in an experimental study where wild type (WT) C57BL6 mice were infected by *H. pylori* for 18 months, we did not observe any brain amyloid induction or

increased neuroinflammation (data submitted for publication) whereas Wozniak *et al.* (23) and Little *et al.* (20) detected amyloid plaques in the brains of WT mice infected with HSV and *C. pneumoniae* respectively.

Despite failing to induce amyloid deposition in a WT murine model, we decided to test the hypothesis that *H. pylori* infection may worsen damage described in a transgenic (Tg) mouse model of AD. To confirm this hypothesis, we infected APPswe/PS1dE9 mice and their WT littermates with *Helicobacter* spp and we studied their behaviour, brain amyloid deposition and neuroinflammation.

Materials and Methods

Animals

All animal experiments were performed in level 2 animal facilities at the University of Bordeaux according to institutional guidelines defined by the local Ethical Committee of the University of Bordeaux and in conformity with the French Ministry of Agriculture Guidelines on Animal Care and the French Committee of Genetic Engineering (approval number No. 50120144-A).

Double transgenic male APP^{swe}/PS1^{dE9} mice were free of pathogenic agents including *Helicobacter* species (Jackson Laboratory stock number 005864, Bar Harbor, ME, USA). The colony was maintained as hemizygotes by crossing Tg mice with B6C3F1/J mice in individual ventilated cages. Male littermates were used for WT controls. The Tg mice expressed a mutant form of the human familial AD variant of PS1^{dE9} (deletion of exon 9) and a chimeric mouse/human amyloid precursor protein APP^{swe} (mouse APP695) harbouring a human A β domain and mutations K595N and M596L linked to Swedish familial AD kindred under the control of the mouse prion protein promoter (34, 35). This mouse model presents an increased amount of brain amyloid deposits, neuroinflammation and cognitive deterioration with age (36, 37). All mice were genotyped using DNA collected from the tail.

Thirty 12-week old female NMRI mice were used as stimuli in the direct social interaction test. They were purchased from Charles River (Boston, MA, USA) and were germfree, housed in groups of 4-5 individuals, and left undisturbed for at least two weeks before being used for testing.

Infection of mice with *Helicobacter* species

For mice infection, *H. pylori* SS1 and *Helicobacter felis* CS1 strains were grown on agar plates and cultured under microaerobic conditions (N₂: 85%; O₂: 5%; CO₂: 10%) at 37°C as previously described (38). Ten week-old WT and Tg males were infected by oral gavage with the bacterial suspension every day for 3 days (*H. pylori* SS1, n=75, and *H. felis* CS1, n=75) at 3 weeks of age as described previously (38, 39). Non-infected mice (control group, n=75) were given phosphate buffered saline (PBS) alone. Groups of 30 WT and 45 Tg were used for each specific infection, based on the expected mortality rate of 33% (40). Mice were housed five per microisolator cage on ventilated shelves on a 12-hour day/night cycle with constant humidity and temperature control, with a low content vitamin diet and water *ad libidum*. All testing occurred during the light phase.

Behavioural procedures

Cognitive performance was evaluated at 4, 6 and 10 months of age. For that, one-third of the non-infected (n=20), the *H. pylori* SS1 infected mice (n=20) and the *H. felis* infected mice (n=20) were cognitively tested and sacrificed at each time point (**Figure 1**). Each subgroup consisted of half Tg and half WT mice. Regarding the infectious status, mice could not be tested alternatively because of the risk of cross-contamination between groups. Regarding the number of mice evaluated, the sequence of behavioural testing was repeated two weeks, carried out under identical conditions, so that, half of non-infected mice were tested with the *H. pylori* infected mice the first week and the other half of non-infected mice with the *H. felis* infected mice the second week. Mice were subjected to the same following sequence of behavioural testing. On Day 1, they were assessed in the Y-maze. On Day 2, they were habituated to the object arena and their open field behaviour was recorded without the two

identical objects, followed on Day 3 by the sequential object location test. Finally, on the last Day 4, the direct social interaction was recorded.

Spatial recognition in the Y-maze

Apparatus and procedures

A grey plastic Y-maze adapted to the size of the biosafety cabinet was designed as follows: three identical arms were spaced at 120° from each other, and they measured 35 cm long, 5.2 cm wide and 9.8 cm high. A Plexiglass plate covering the Y-maze was used to avoid the mice escaping. Extra maze visual cues were put on the walls of the safety cabinet. A camera localized above the Y-maze tracked images.

Each mouse was isolated in a cage (365 x 207 x 140 mm) for 20 min. During the first sample period, the mouse was placed at the end of the “start” arm and allowed to explore freely both the “start” and the “familiar” arm for 5 min, while the third arm (“novel” arm) was closed by a grey door at the entrance. Then the mouse was removed from the Y-maze and placed for 10 min in its waiting cage. During the second test period, the door blocking the “novel arm” was removed. The mouse was placed at the end of the same “start arm” and allowed to explore the entire maze for 2 min. Timing of the 2 min test phase period was initiated only once the mouse had left the start arm. In the interval between the sample and the test phase, the apparatus was cleaned with alcohol and water to remove odour residue. Allocation of arms (“start”, “familiar” and “novel”) was counterbalanced within each experimental group.

Variables measured

An observer, unaware of either the genotype or the infectious status, measured the time spent in the “start”, “familiar” and “novel” arms. The time spent exploring the “novel” arm

was compared according to the different genotype/infectious groups. A ratio of the time spent in the “novel” arm divided by the time spent in all three arms (Preference Index) was calculated.

Open field

Apparatus and procedures

After being isolated for at least 10 minutes, mice were habituated to the open field arena (425 x 266 x 185 mm) on Day 2. The bottom and sides of the cage were made of plastic covered with an opaque tissue. They were allowed to explore the arena freely for 20 min and were recorded with a digital camera placed above the arena. The centre of the arena was defined as a remote rectangle 5 cm from the arena edges.

Variables measured

Recorded videoframes were analyzed using Ethovision Software (Noldus, Wageningen, The Netherlands). The total distance moved and the percentage of time spent in the centre were measured as indicators of the locomotor performance and the emotional reactivity, respectively.

New object location

Apparatus and procedures

On Day 3, two identical dark parallelepiped objects were put in adjacent corners of the arena. Mice were free to explore these two objects for 10 min after which they were removed and placed in a holding cage for 30 min. In the second trial, one of the identical objects was moved to a new location (another corner of the arena so that the two objects were at opposite positions) and mice were allowed to explore them for 5 min.

Variables measured

An observer, blind to all conditions, manually scored the object exploration times using then recorded images. The time spent exploring the new object (i.e. sniffing the object) and preference index (ratio of time spent exploring the object at the new location divided by the time spent exploring the 2 objects) were compared between genotype/infectious groups. The preference index was also compared to the chance level (50%, one-sample t-test).

Direct social interaction with an adult female

Apparatus and procedures

Direct social interaction was evaluated in a standard mouse cage in which the experimental animals were isolated for 1 hour for habituation. An unfamiliar stimulus mouse (a 12-week-old NMRI female) was introduced into the cage and left for 3 min. A camera located in front of the cage tracked images. Each stimulus animal was employed several times in the same experiment (2-3 times in total). The use and order of presentation of the stimulus animal were balanced across genotypes. The NMRI strain is commonly employed in studies of social behaviour, because of its high level of sociability (41).

Variables measured

An observer, unaware of the genotype and the infectious status, analyzed images between 0 and 3 min using ETHOLOG software (42). The recorded time that the experimental animal spent performing several behavioural categories was scored (43). Sniffing the anogenital region, the nose or the rest of the body, allogrooming (i.e. grooming the NMRI mouse) and mounting were considered as affiliate behaviour. Digging, self-grooming and rearing were considered as non-social activities.

Histological analysis

Tissue processing

After behavioural procedures, mice were anesthetized with isoflurane and ketamine/xylazine. Then mice were euthanized by cervical dislocation. Stomachs were removed and fixed for 24 h in a 3.7 % neutral-buffered formalin solution (Sigma Aldrich, Saint Louis, MI, USA). Brains were removed and cut longitudinally; half of the brain was fixed in 4% paraformaldehyde with 0.01% glutaraldehyde solution (Sigma Aldrich) and the other half was dissected in several parts (cortex and hippocampus) and frozen at -80°C. Stomach and brain fixations were followed by standard histological processing and paraffin embedding.

Histological and immunohistochemical staining

Three μm sections from paraffin-embedded stomachs were processed for hematoxylin/eosin/safran (HES) staining following the standard procedure. Five μm brain sections were deparaffinised, rehydrated and stained with 1% thioflavin-S (Sigma Aldrich) for 8 min then washed with Tris buffered saline (TBS) (2 times 15 min) and 50% ethanol solution (2 times 15 min), and mounted with Vectashield anti-fade mounting medium (Vector Laboratories, Peterborough, UK).

For immunohistochemistry detection, 5 μm sections from paraffin-embedded brains were rehydrated, washed and heated to 100°C for 30 min for antigen retrieval using a homemade buffer, Tris ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA 1 mM), pH 9, then left for 30 min at room temperature (RT). After washing in TBS (3 times 10 min), endogenous peroxidases were inhibited with 3% hydrogen peroxide in H₂O for 5 min. Sections were blocked for 30 min in a solution of bovine serum albumin (BSA, 1%) with goat serum (10%) in TBS (Sigma Aldrich).

Slides were then incubated for 3 h at RT with primary rabbit anti-GFAP (1:2000) (Dako, Trappes, France) or anti-iba-1 (1:1000) (Wako, Osaka, Japan) (Invitrogen, Saint Aubin, France) for detection of astroglia and microglia, respectively, followed by a 30 min incubation at RT with labelled polymer-HRP anti-rabbit antibodies (DAKO Envision Systems, Dako), washed with TBS and revealed by an additional 10 min incubation with Liquid DAB Substrate-Chromogen System (DAKO) at RT. Slides were counterstained with haematoxylin, dehydrated and mounted with Eukitt-mounting medium (Labonord, Pessac, France).

Histological scoring

Gastric histology was scored blindly using a numerical scale of 1 to 4 for quantification of inflammation as previously described (38). Hippocampal and cortical GFAP-positive astrocyte and iba-1-positive microglial cell counts and areas were determined automatically by Mercator software (Explora Nova, Mercator, La Rochelle, France) on coronal sections localized approximately 1.8 mm behind the bregma when scanned by Panoramic viewer 1.15 (3D Histech, Budapest, Hungary) (44). The threshold of detection was held constant during analysis and all measurements were conducted in a blinded fashion. Amyloid plaques on thioflavin-S slides were counted manually also in a blinded fashion.

Quantitative real-time PCR (q-PCR).

Cortical and hippocampal brain tissue samples were homogenized in Trizol (Fermentas, Fisher Scientific SAS, Illkirch, France) and RNA was isolated using a standard chloroform/isopropanol protocol (45). RNA was processed and analyzed following an adaptation of published methods (46, 47). Briefly, cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using RevertAid Premium Reverse Transcriptase (Fermentas) and primed with oligo-dT

primers (Fermentas) and random primers (Fermentas). Q-PCR was performed using a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Meylan, France). Q-PCR reactions were carried out in duplicate for each sample, using transcript-specific primers, cDNA (4 ng) and LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) in a final volume of 10 µl. The PCR data were exported and analyzed in an informatics tool (Gene Expression Analysis Software Environment) developed at the Neuro Centre Magendie, in Bordeaux, France. For the determination of the reference gene, the Genorm method was used (47). Relative expression analysis was corrected for PCR efficiency and normalized against two reference genes. In particular, the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) and the tubulin alpha 4A (*tuba4a*) genes were used as reference genes for the brain cortex, while the translation elongation factor 1 (*eef1a1*) and the succinate dehydrogenase complex subunit A (*sdha*) genes were used as reference genes for the hippocampus. The relative level of expression was calculated using the comparative ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method with non-infected WT mice as reference at each point of sacrifice (48). Primer sequences are reported in table 1. The level of gene expression concerned the neuroinflammation: astrocytes (*gfap*, *vimentin*), microglia (*iba-1*, *cd11b*), tumour necrosis factor (*tnf*)- α , cyclo-oxygenase 2, nuclear factor-kappa B (*NFkB*) (49, 50), the endothelial cell junction (*occludin*, *claudin-5* (51, 52)) and finally *human app*.

Statistical analysis

Quantitative results were expressed as a mean +/- standard error (SE). At each age of sacrifice (M4, M6 and M10) cognitive and histological data were analyzed using a two way-ANOVA with infectious status and genotype as between-group factors followed by a post hoc Tukey's test. For the comparison of amyloid plaques and mRNA *human app*, age and

infectious status were used as factors for the two-way ANOVA. For the new object location, the preference index was also compared to chance level (0.5, one-sample t-test).

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Behaviour

Y-maze

During the first sample period, mice showed no preference for either of the two arms of the maze (data not shown). No significant effect of the infection or the genotype was observed at 4 and 6 months of age regarding the time spent in the new arm (**Figure 2**, upper) and the Preference Index (**Figure 2**, lower). At 10 months of age, Tg mice spent less time in the new arm (genotype effect $F(1, 50)=5.55$, $p=0.022$) irrespective of the infectious status (genotype x infection interaction $F(2, 50)=0.87$, $p=0.42$) and the Preference Index was decreased in the Tg mice (genotype effect $F(1,53)=6.38$, $p=0.015$) irrespective of the infectious status (infection x genotype interaction $F(2, 53)= 0.91$, $p=0.41$).

Open field

During habituation of the arena (**Figure 3**), at 4 months of age, *H. pylori* Tg mice travelled a greater distance than the other groups of mice contributing to a significant effect of infection ($F(2, 53)=8.91$, $p<0.001$) and genotype ($F(1, 53)=10.5$, $p<0.001$), but no significant genotype x infection interaction was observed ($F(2, 53)=2.26$, $p=0.11$). At 6 and 10 months of age, no effects of infection or genotype were observed. The percentage of time spent in the centre was not significantly different regarding genotype and infectious status.

Novel object location

While no effect was observed at 4 and 6 months, at 10 months of age, Tg mice spent more time sniffing the object at the new location ($F(1, 57)=11.1$, $p<0.001$); this was irrespective of

the infectious status (genotype x infection interaction $F(2, 57)=1.4$, $p=0.25$, **Figure 4**). When the index preference was compared to the chance level (0.5, one simple t-test), non-infected WT ($p=0.013$) and *H. pylori* infected WT mice ($p=0.006$) exhibited a preference for the object at the new location at 4 months of age, while all mice presented a preference for the object at the new location compared to the chance level at 6 months of age. At 10 months of age, only non-infected WT mice ($p=0.024$) and *H. felis* infected WT mice ($p=0.011$) demonstrated a preference for the object at the new location compared to the chance level.

Social interaction

No significant effects of infectious status and genotype were observed neither at 4 nor at 6 months of age. However, at 10 months of age, Tg mice, irrespective of the infection status, displayed lower levels of affiliation compared with their WT littermates (genotype effect $F(1, 54)=25.5$, $p<0.001$; genotype x infection interaction $F(2, 54)=1.01$, $p=0.34$, **Figure 5**). Regarding non-social interaction no significant differences were observed (data not shown).

Gastric inflammation

At 4 months of age, the gastric inflammation score was already higher in infected groups, (infection effect $F(2, 51)=69.3$, $p<0.001$), whether Tg or WT (genotype effect $F(1, 51)=0.15$, $p=0.70$; genotype x age interaction $F(2, 51)=0.80$, $p=0.45$). *H. felis* infection induced a higher inflammation than *H. pylori* (post hoc, $p<0.001$)(**Figure 6**). Gastric inflammation scores at 6 and 10 months of age are not yet available.

Amyloid deposition

Senile plaques were detected in 4 month-old Tg mice and there was an overall increase in

the number of plaques with age (age effect $F(2, 89)=497$, $p<0.001$) (**Figure 7**). Infection was associated with an increase in senile plaques (infection effect $F(2,89)=6.74$, $p=0.02$) irrespective of the genotype ($F(4, 89)=1.7$, $p=0.15$). In fact, at 6 months of age, the number of plaques increased in the *H. pylori* infected group (post hoc, $p=0.04$). This difference was confirmed at 10 months of age (post hoc, $p=0.03$). Results are presented in **Figure 8**.

Neuroinflammation

Representative pictures of iba-1-positive microglial cells in the cortex of infected and non-infected mice at different ages are shown in **Figure 9**. Quantitative results are not yet available at 4 and 6 months of age. At 10 months of age, iba-1-positive microglial cells were more numerous (genotype effect $F(2, 64)=19.2$, $p<0.001$) and occupied a larger area (genotype effect $F(1, 66)=19.4$, $p<0.001$) in the Tg mouse hippocampus. This effect was also observed in the Tg mouse cortex (number of cells (genotype effect $F(1,59)=61.9$, $p<0.001$); cell area (genotype effect $F(1,65)=36.3$, $p<0.001$)). No infection effect was observed and there was no interaction between age and infection (**Figure 10**).

Results also showed more numerous GFAP-positive astroglial cells which occupied a higher area in the cortex of Tg mice compared to WT mice at 10 months of age (genotype effect area ($F(1,54)=64$, $p<0.001$); number ($F(1, 52)=110$, $p<0.001$)). Representative pictures are shown in **Figure 11**. In the hippocampus no difference between genotype was noticed. The infection was not associated with an increase in astroglial activation in the cortex or in the hippocampus (**Figure 12**).

Quantitative real-time PCR (q-PCR)

Results of quantitative real-time PCR in the cortex and the hippocampus are presented in **Figures 13** and **14**, respectively.

At 10 months of age, irrespective of the infectious status, Tg mice exhibited increased cortical messenger RNA (mRNA) levels of *iba1* ($F(1,54)=34.3$, $p<0.001$), *cd11b* ($F(1,54)=22$, $p<0.001$) *gfap* ($F(1, 54)=270$, $p<0.001$), *tnf- α* ($F(1, 54)=29$, $p<0.001$) and *il-6* ($F(1,54)=12.1$, $p<0.001$). These increases in Tg mice were also present from 6-months of age for *gfap* ($F(1, 54)=77$, $p<0.001$) and for *tnf- α* ($F(1, 54)=7$, $p=0.001$). Infections, irrespective of the genotype, were associated with a decrease in cortical mRNA levels of expression of *iba1* ($F(1, 51)=14$, $p<0.001$) from 6 months of age and of *gfap* ($F(1, 51)=3.4$, $p=0.038$), *nfkB* ($F(1, 51)=12.2$, $p<0.001$), *cox 2* ($F(1, 51)=23.2$, $p<0.001$) and *cd11b* ($F(1, 51)=15$, $p<0.001$) from 4 months of age. However infection was associated with an increase in cortical mRNA levels of *il-6* at 10 months of age irrespective of the genotype (infection effect $F(1, 24)=3.2$, $p=0.048$). Cortical or hippocampal human APP mRNA decreased in Tg infected mice (infection effect, cortex $F(2, 81)=10$, $p<0.001$; hippocampus $F(2, 79)=8.2$, $p<0.001$). Infection was associated with a decrease in *claudin-5* mRNA levels (infection effect $F(1, 53)=9.3$, $p<0.001$) at 6-months of age but with an increase at 10-month of age (infection effect $F(1, 53)=10$, $p<0.001$). Results in the hippocampus showed the same trends.

Discussion

Several epidemiological studies support a link between AD and *H. pylori* infection (27-33, 53) but potential confounding factors could explain such an association. To bypass these epidemiological elements, especially socioeconomic conditions, we studied the impact of the infection in a murine model of AD.

The main result of this study is the increase in the amyloid plaque number in the brain of *H. pylori* infected Tg mice compared to non-infected Tg mice from 6 months of age. However this result has to be considered cautiously. In fact, amyloid plaques were manually counted and the area occupied by these amyloid plaques was not available. In principle, this manual method can be considered suitable because indeed the number of plaques in brain samples of non-infected Tg mice is comparable to data previously published (37). However, the number of plaques is an indirect element of the amyloid burden. Moreover, the level of expression of the *human app* gene was lower in infected Tg mice. These preliminary histological results have to be confirmed by an automatic quantification (number and area) after slide scanning.

One of the several hypotheses explaining the link between *H. pylori* infection and AD is based on the possible increase in brain inflammation *via* an induced systemic inflammation. Whereas we found increased neuroinflammation in the brain of Tg mice compared to WT mice as previously described in this murine model (49), histological results showed no difference regarding infectious status and to the contrary, brain expression of several neuroinflammation genes (*iba-1*, *gfap*, *cd11b*, *tnf- α* , *nfkb*, *cox2*) measured by q-PCR was decreased due to the infection at 4 and 6 months of age. We do not have an explanation for this decrease. These results do not support our hypothesis of an impact of the inflammation induced by *H. pylori* on neuroinflammation. Thereby, the association between the *H. pylori*

infection and systemic inflammation is still debatable (54-63). Moreover, the choice of a reliable marker of systemic chronic inflammation is difficult because most of them have a short half-life. Two *Helicobacter* species were used in this study. *H. pylori* is the main species responsible for infection in humans and *H. felis* is known to induce higher gastric inflammation than *H. pylori* in mice (38). In the future, it would be interesting to test a correlation between gastric inflammation, amyloid burden, cognitive deficits and neuroinflammation and to measure several pro-inflammatory cytokines in mouse serum.

Another hypothesis regarding the *H. pylori*-AD link is a vascular association. Amyloid angiopathy was not examined in this study but the expression of two endothelial cell junction genes was considered without conclusive results whereas A β seems to influence endothelial cell tight junctions in the human brain (51) and the rat brain (52).

Although *H. pylori* infection was associated with more numerous brain amyloid plaques, its influence on behaviour was not detected in this study. In fact, infection was not associated with a behavioural deterioration. Among the four cognitive tests used, direct social interaction, novel object location and Y-maze presented a difference between Tg and WT mice at 10 months of age. The open field showed that WT and Tg mice had the same locomotor performance and emotional reactivity. A comparison of these results with previously published data is difficult because they were run under specific conditions. In fact, *H. pylori* is a class I human carcinogen according to the World Health Organization (64), so behavioural tests with infected experimental animals had to be carried out in a safety cabinet. Consequently we had to take several constraints into consideration, especially space, noise and light. Because of the ventilation under the safety cabinet, the odour recognition task was not carried out. The hippocampal-dependent spatial learning was evaluated by the Y-maze instead of the more widely used Morris water maze (40, 49) because it was not

feasible in our study. Direct social interaction was already carried out with double mutant AD Tg mice but not with our exact strain (43), however other social tests have been used with our strain (65). Finally, despite the technical difficulties, three tests were validated and no association between infection and behavioural deterioration was found.

The negative results of our study can be explained by several elements. First of all, *Helicobacter* species infection, despite positive epidemiological studies, does not have an impact on the severity of AD. Second, by the choice of three evaluation time points (4, 6 and 10 months of age) was debatable. In the APPswe/PS1dE9 murine model, amyloid plaques appeared between 4 and 6 months of age (34, 36, 37), and some cognitive deficits appeared before amyloid deposition like novel object location (66) and most the studies found cognitive deficits around 7-8 months of age (40, 49, 67). Therefore, by choosing 4 and 6 months of age, our aim was to determine whether the infection accelerates amyloid deposition and cognitive deficits. The end point at 10 months of age was established to confirm 4 and 6 month results. However, *a posteriori*, this endpoint seems too early. In fact, neuroinflammation and cognitive deficits were only present at 10 months of age. A later point would have possibly provided more information. Finally, this AD murine model only reproduces amyloid pathology and not Tau pathology, the other histological hallmark of AD. Thus we cannot exclude that *Helicobacter* infection is associated with the Tau pathology. In a previous study, we found that AD patients infected by *H. pylori* had a higher level of phosphorylated protein Tau in cerebrospinal fluid compared to non-infected AD patients (53).

In conclusion, this preliminary animal study explored for the first time a possible association between AD and *H. pylori* infection. *H. pylori* appears to be associated with an increased

amyloid burden but this result needs to be confirmed by an automated analysis. This increase in the amyloid burden was not associated with deteriorating behaviour or with an increased neuroinflammation in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. More studies are needed to conclude whether there is an association or not between AD and *Helicobacter* infection.

Acknowledgments including sources of support

CR was a recipient of a fellowship from the French Alzheimer Plan. LB was a recipient of a studentship from the French Ministry for Research. The Cancéropole Grand Sud Ouest funded Alban Giese and the Experimental Histology Unit. This project was supported by the grant LABEX BRAIN-ANR-10-LABX-43.

Conflict of interest: none

References

1. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*;297(5580):353-356.
2. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256(5054):184-185.
3. Boche D, Nicoll JA. The role of the immune system in clearance of Abeta from the brain. *Brain pathology*2008;18(2):267-278.
4. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*;330(6012):1774.
5. Griffin WS, Barger SW. Neuroinflammatory Cytokines-The Common Thread in Alzheimer's Pathogenesis. *US Neurol* 2010;6(2):19-27.
6. McGuinness B, Todd S, Passmore AP, et al. Systematic review: Blood pressure lowering in patients without prior cerebrovascular disease for prevention of cognitive impairment and dementia. *J Neurol, Neurosurg Psychiatry* 2008 Jan;79(1):4-5.
7. Benarroch EE. Neurovascular unit dysfunction: a vascular component of Alzheimer disease? *Neurology* 2007;68(20):1730-1732.
8. Fischer O. Miliare Nekrosen mit drusigen Wucherungen der Neruofibrillen, eine regelmässige Veränderung der Hirnrinde bei seniler Demenz. *Monarschr F Psychiat Neurol*. 1907;22:361-372.
9. Balin BJ, Gerard HC, Arking EJ, et al. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol* 1998;187(1):23-42.
10. Gerard HC, Dreses-Werringloer U, Wildt KS, et al. *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;48(3):355-366.
11. Hammond CJ, Hallock LR, Howanski RJ, et al. Immunohistological detection of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's disease brain. *BMC Neurosci* 2010;11:121.
12. Itabashi S, Arai H, Matsui T, et al. Herpes simplex virus and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 1997;349(9058):1102.
13. Itzhaki RF, Lin WR, Shang D, et al. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 1997;349(9047):241-244.
14. Jamieson GA, Maitland NJ, Wilcock GK, et al. Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *J Med Virol* 1991;33(4):224-227.
15. Letenneur L, Peres K, Fleury H, et al. Seropositivity to herpes simplex virus antibodies and risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study. *PLoS One* 2008;3(11):e3637.
16. Loeb MB, Molloy DW, Smieja M, et al. A randomized, controlled trial of doxycycline and rifampin for patients with Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 2004;52(3):381-387.
17. MacDonald AB. Borrelia in the brains of patients dying with dementia. *JAMA* 1986;256(16):2195-2196.
18. Miklossy J. Alzheimer's disease - a neurospirochetosis. Analysis of the evidence following Koch's and Hill's criteria. *J Neuroinflammation* 2011;8:90.
19. Alvarez G, Aldudo J, Alonso M, et al. Herpes simplex virus type 1 induces nuclear accumulation of hyperphosphorylated tau in neuronal cells. *J Neurosci Res* 2012;90(5):1020-1029.
20. Little CS, Hammond CJ, MacIntyre A, et al. *Chlamydia pneumoniae* induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice. *Neurobiol Aging* 2004;25(4):419-429.

21. Miklossy J, Kis A, Radenovic A, et al. Beta-amyloid deposition and Alzheimer's type changes induced by *Borrelia spirochetes*. *Neurobiol Aging* 2006;27(2):228-236.
22. Piacentini R, Civitelli L, Ripoli C, et al. HSV-1 promotes Ca²⁺ -mediated APP phosphorylation and A β accumulation in rat cortical neurons. *Neurobiol Aging* 2010;32(12):2323 e2313-2326.
23. Wozniak MA, Itzhaki RF, Shipley SJ, et al. Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation. *Neurosci Lett* 2007 2010;429(2-3):95-100.
24. Zambrano A, Solis L, Salvadores N, et al. Neuronal cytoskeletal dynamic modification and neurodegeneration induced by infection with herpes simplex virus type 1. *J Alzheimers Dis* 2008;14(3):259-269.
25. Holmes C. Review: systemic inflammation and Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013;39(1):51-68.
26. Konturek SJ, Konturek PC, Konturek JW, et al. *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. *J Physiol Pharmacol* 2006;57 Suppl 3:29-50.
27. Kountouras J, Tsolaki M, Gavalas E, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer disease. *Neurology* 2006;66(6):938-940.
28. Malaguarnera M, Bella R, Alagona G, et al. *Helicobacter pylori* and Alzheimer's disease: a possible link. *Eur J Intern Med* 2004;15(6):381-386.
29. Roubaud Baudron C, Letenneur L, Langlais A, et al. Does *Helicobacter pylori* infection increase incidence of dementia? The Personnes Agees QUID Study. *J Am Geriatr Soc* 2013;61(1):74-78.
30. Beydoun MA, Beydoun HA, Shroff MR, et al. *Helicobacter pylori* seropositivity and cognitive performance among US adults: evidence from a large national survey. *Psychosom Med* 2013;75(5):486-496.
31. Chang YP, Chiu GF, Kuo FC, et al. Eradication of *Helicobacter pylori* Is Associated with the Progression of Dementia: A Population-Based Study. *Gastroenterol Res Pract* 2013; 2013:175-729.
32. Huang WS, Yang TY, Shen WC, et al. Association between *Helicobacter pylori* infection and dementia. *J Clin Neurosci* 2014.
33. Katan M, Moon YP, Paik MC, et al. Infectious burden and cognitive function: the Northern Manhattan Study. *Neurology* 2013;80(13):1209-1215.
34. Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* 2004;13(2):159-170.
35. Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, et al. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng* 2001;17(6):157-165.
36. Ruan L, Kang Z, Pei G, et al. Amyloid deposition and inflammation in APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2009;6(6):531-540.
37. Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, et al. Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 2006;24(3):516-524.
38. Varon C, Dubus P, Mazurier F, et al. *Helicobacter pylori* infection recruits bone marrow-derived cells that participate in gastric preneoplasia in mice. *Gastroenterology* 2012;142(2):281-291.

39. Fox JG, Rogers AB, Whary MT, et al. Accelerated progression of gastritis to dysplasia in the pyloric antrum of TFF2 -/- C57BL6 x Sv129 *Helicobacter pylori*-infected mice. *Am J Pathol* 2007;171(5):1520-1528.
40. Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, et al. Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci* 2010 5;30(18):6367-6374.
41. D'Amato FR, Pavone F. Reunion of separated sibling mice: neurobiological and behavioral aspects. *Neurobiol Learn Mem* 1996;65(1):9-16.
42. Ottoni EB. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav Res Methods Instrum Comput* 2000;32(3):446-449.
43. Pietropaolo S, Delage P, Lebreton F, et al. Early development of social deficits in APP and APP-PS1 mice. *Neurobiol Aging* 2012;33(5):1002 e1017-1027.
44. Paxinos G, Franklin K. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press 2001.
45. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-159.
46. Favereaux A, Thoumine O, Bouali-Benazzouz R, et al. Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain. *Embo J* 2011;30(18):3830-3841.
47. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55(4):611-622.
48. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 2001;25(4):402-408.
49. Zhang W, Bai M, Xi Y, et al. Multiple inflammatory pathways are involved in the development and progression of cognitive deficits in APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiol Aging* 2012;33(11):2661-2677.
50. Li W, Poteet E, Xie L, et al. Regulation of matrix metalloproteinase 2 by oligomeric amyloid beta protein. *Brain Res* 2011;1387:141-148.
51. Carrano A, Hoozemans JJ, van der Vies SM, et al. Neuroinflammation and blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Neurodegener Dis* 2012;10(1-4):329-331.
52. Marco S, Skaper SD. Amyloid beta-peptide1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells. *Neurosci Lett* 2006;401(3):219-224.
53. Roubaud-Baudron C, Krolak-Salmon P, Quadrio I, et al. Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease: preliminary results. *Neurobiol Aging* 2012;33(5):1009 e1011-1009.
54. Danesh J, Whincup P, Walker M, et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ* 2000;321(7255):199-204.
55. Kanbay M, Gur G, Yucel M, et al. Does eradication of *Helicobacter pylori* infection help normalize serum lipid and CRP levels? *Dig Dis Sci* 2005;50(7):1228-1231.
56. Liu L, Liu Y, Tong W, et al. Pathogen burden in essential hypertension. *Circ J* 2007;71(11):1761-1764.
57. Lu YH, Yen HW, Lin TH, et al. Changes of coronary risk factors after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *J Med Sci* 2002;18(6):266-272.
58. Patel P, Mendall MA, Carrington D, et al. Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *BMJ* 1995;311(7007):711-714.

59. Perri F, Clemente R, Festa V, et al. Serum tumour necrosis factor-alpha is increased in patients with *Helicobacter pylori* infection and CagA antibodies. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31(4):290-294.
60. Russo F, Jirillo E, Clemente C, et al. Circulating cytokines and gastrin levels in asymptomatic subjects infected by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001;23(1):13-24.
61. Singh RK, McMahon AD, Patel H, et al. Prospective analysis of the association of infection with CagA bearing strains of *Helicobacter pylori* and coronary heart disease. *Heart* 2002;88(1):43-46.
62. Stone AF, Mendall MA, Kaski JC, et al. Effect of treatment for Chlamydia pneumoniae and *Helicobacter pylori* on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina (STAMINA). *Circulation* 2002 3;106(10):1219-1223.
63. Torgano G, Cosentini R, Mandelli C, et al. Treatment of *Helicobacter pylori* and Chlamydia pneumoniae infections decreases fibrinogen plasma level in patients with ischemic heart disease. *Circulation* 1999;99(12):1555-1559.
64. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 1994;61:1-241.
65. Cheng D, Logge W, Low JK, et al. Novel behavioural characteristics of the APP(Swe)/PS1DeltaE9 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 2013;245:120-127.
66. Bonardi C, de Pulford F, Jennings D, et al. A detailed analysis of the early context extinction deficits seen in APPswe/PS1dE9 female mice and their relevance to preclinical Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 2011;222(1):89-97.
67. Phillips M, Boman E, Osterman H, et al. Olfactory and visuospatial learning and memory performance in two strains of Alzheimer's disease model mice-a longitudinal study. *PLoS One* 2011;6(5):e19567.

Figures

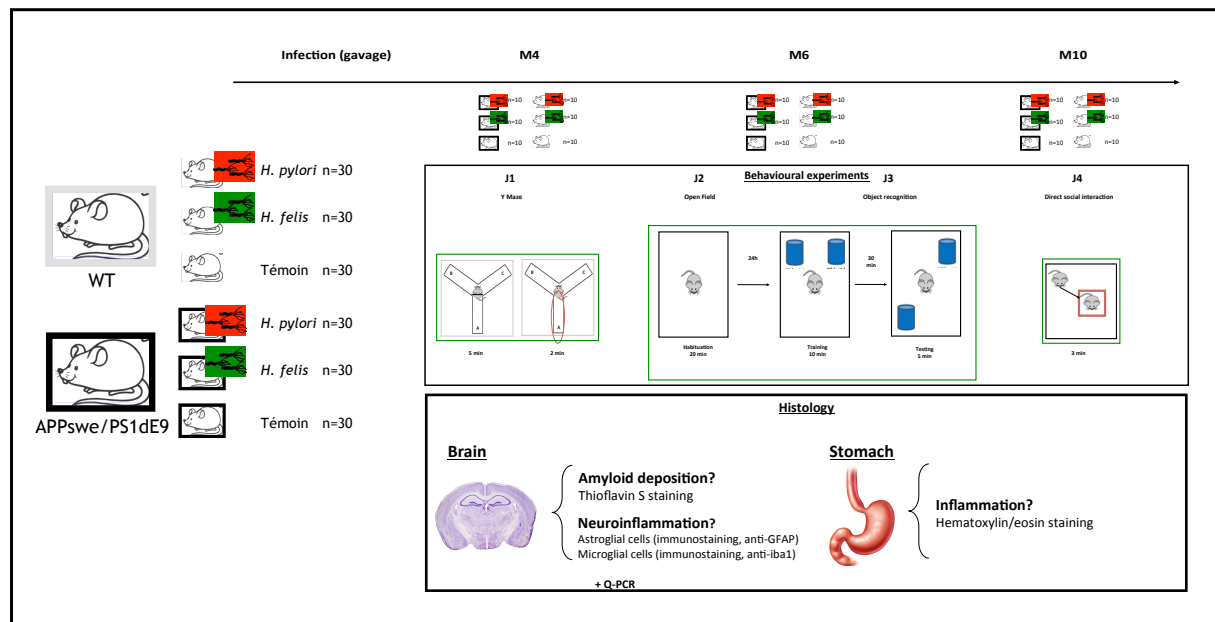


Figure 1. Behavioural procedure. Q-PCR, quantitative polymerase chain reaction; WT, wild type;

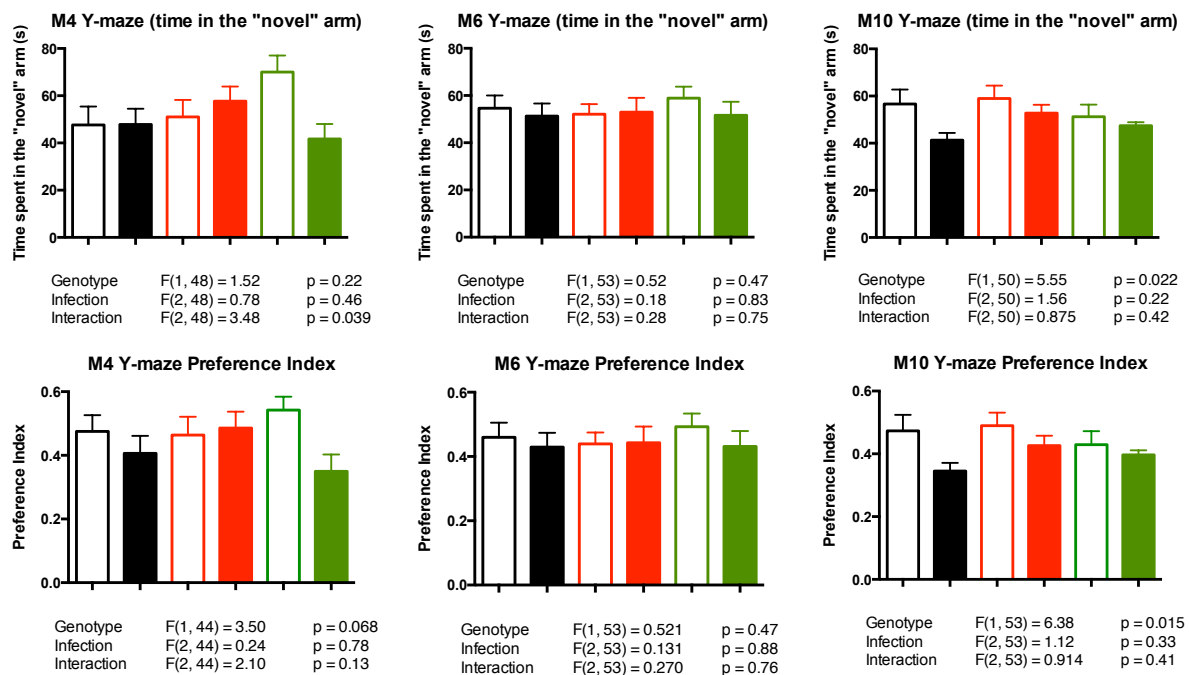


Figure 2. Y-maze. Time spent in the “new” arm (up) and Preference Index (Ratio of the time spent in the “new” arm divided by the time spent in the “new” + “familiar” + “start” arms) (down) at 4, 6 and 10 months of age. Error Bar: ± 1 Standard Error

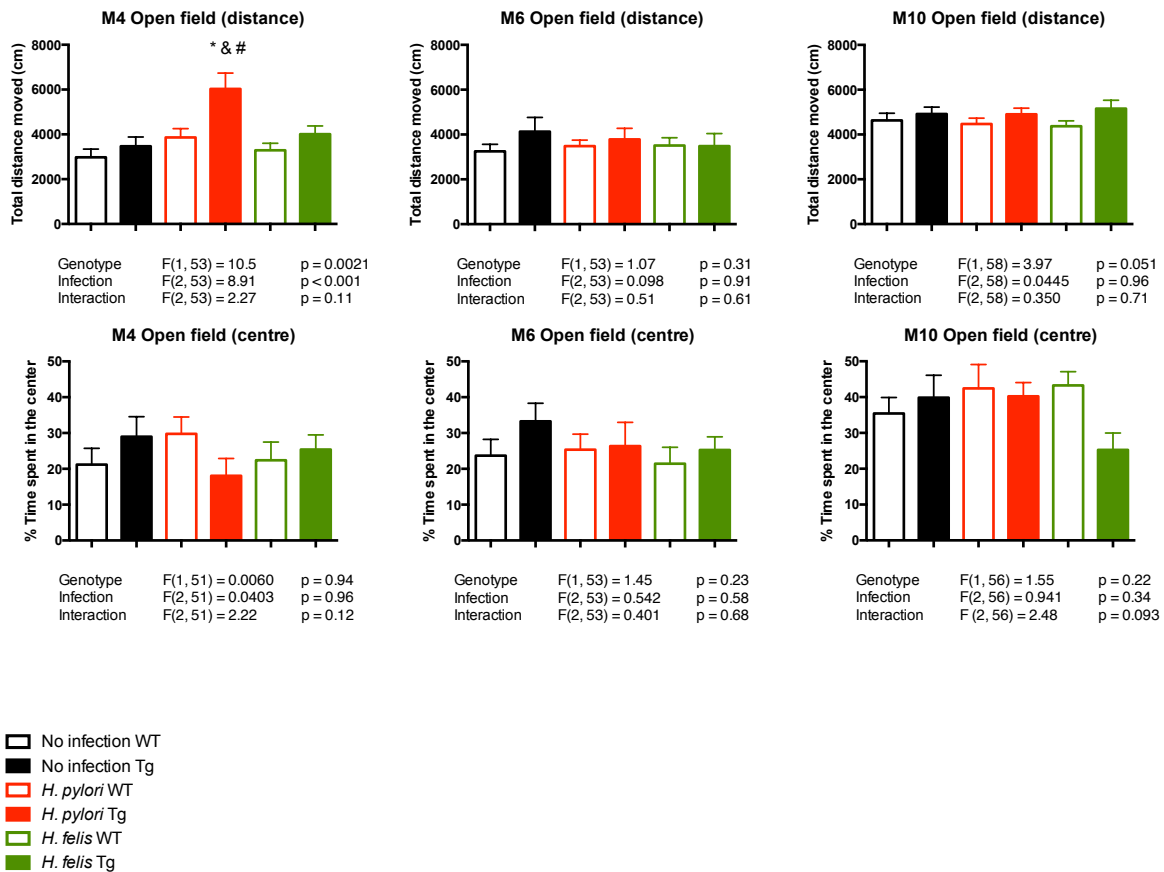


Figure 3. Open field. Total distance moved (up) and percentage of time spent in the centre (down) * <0.05 , non-infected WT versus each other group; & $p<0.05$ *H. pylori* Tg and *H. felis* Tg versus non-infected Tg. # $p<0.05$ WT versus Tg within each infection group. Error Bar: ± 1 Standard Error

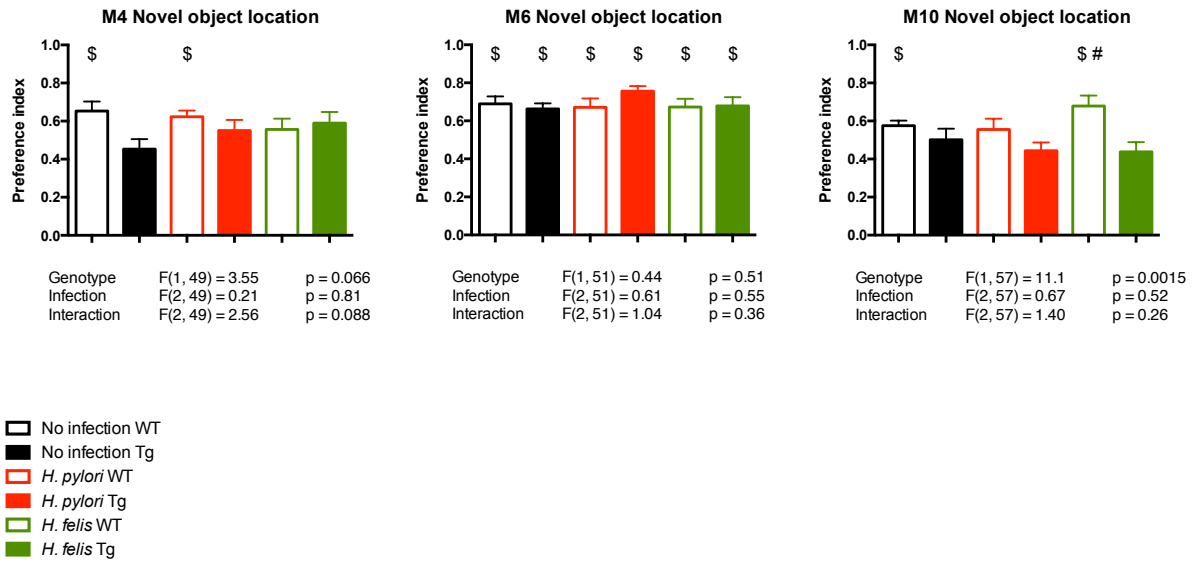


Figure 4. Novel object location. Preference index at 4, 6 and 10 months of age. # $p < 0.05$ WT versus Tg within each infection group. \$ $p < 0.05$ is related to the comparison of the index preference to the chance level (0.5, one simple t-test). Error Bar: ± 1 Standard Error

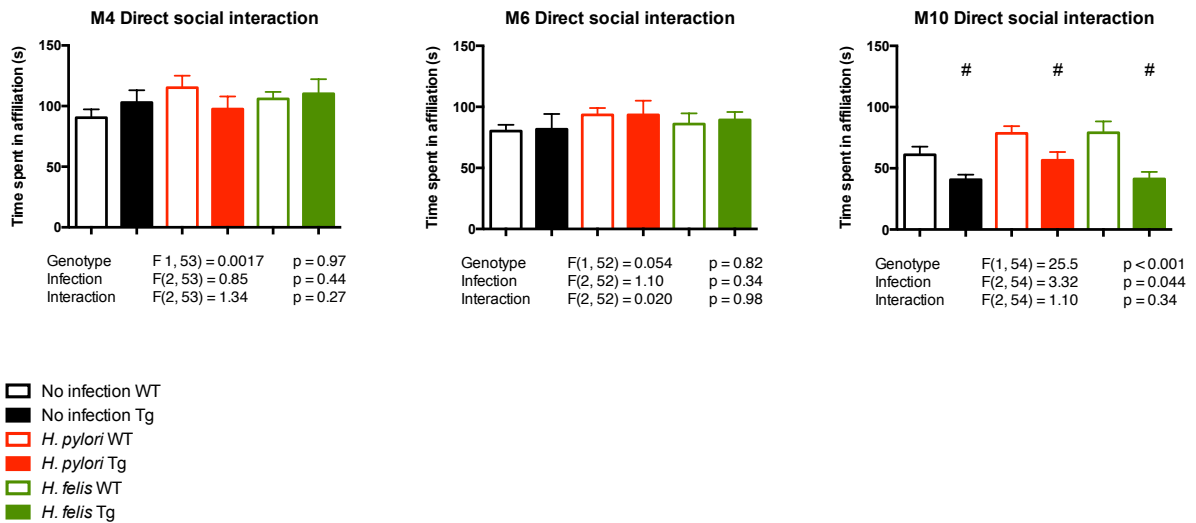


Figure 5. Direct social interaction. Time spent in affiliation 4, 6 and 10 months of age. # $p < 0.05$ WT versus Tg within each infection group. Error Bar: ± 1 Standard Error

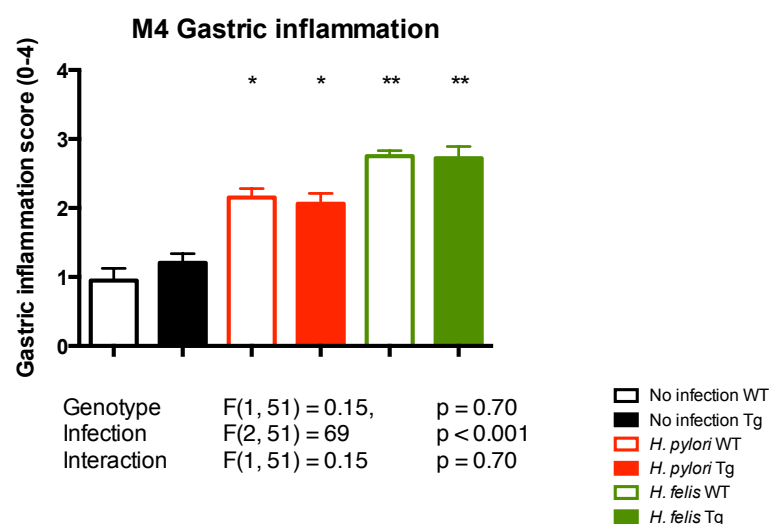


Figure 6. Gastric inflammation at 4 months of age. * $p < 0.05$ versus non-infected WT mice, ** $p < 0.05$ versus *H. pylori* infected WT mice. Error Bar: ± 1 Standard Error

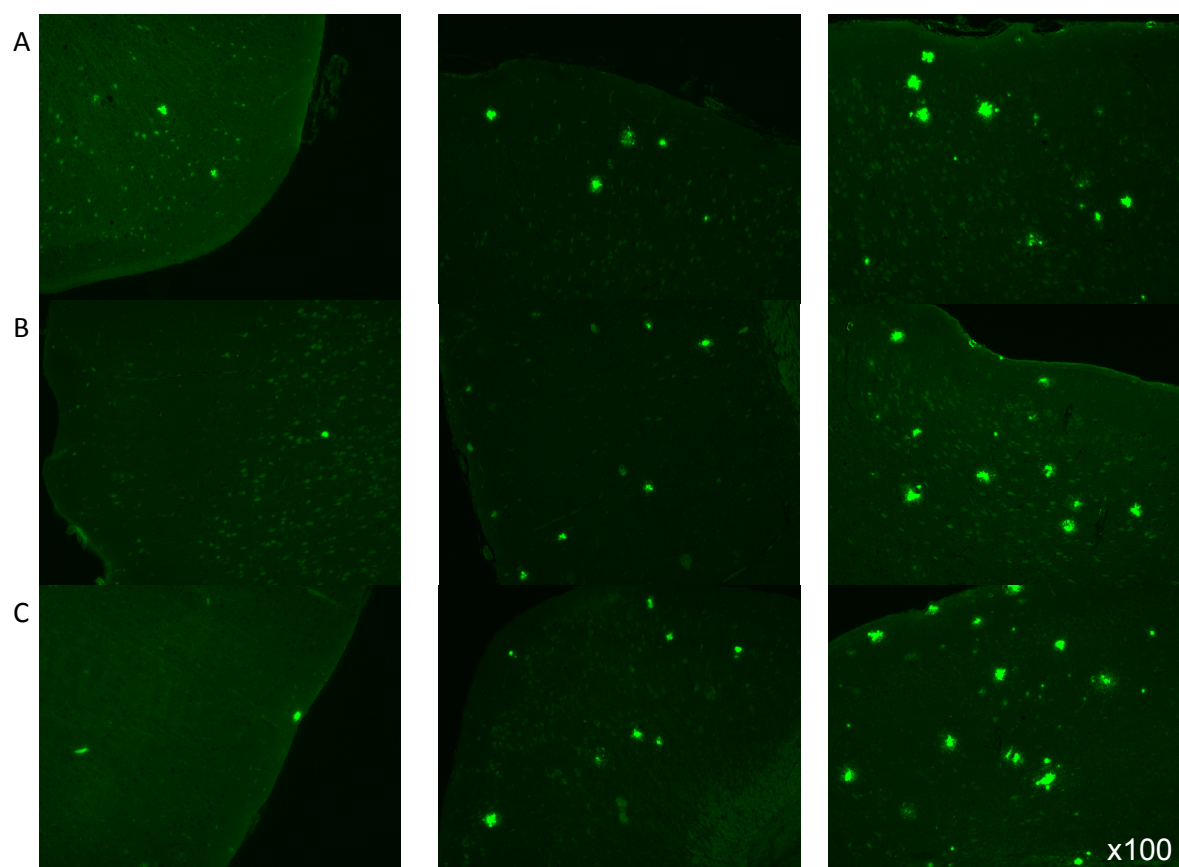


Figure 7. Amyloid deposition. Illustrative example of senile plaque evolution at 4 (left), 6 (middle) and 10 (right) months of age after thioflavin S staining in coronal sections of the cortex from non-infected (A) or infected by *H. pylori* (B) or *H. felis* (C) Tg mice.

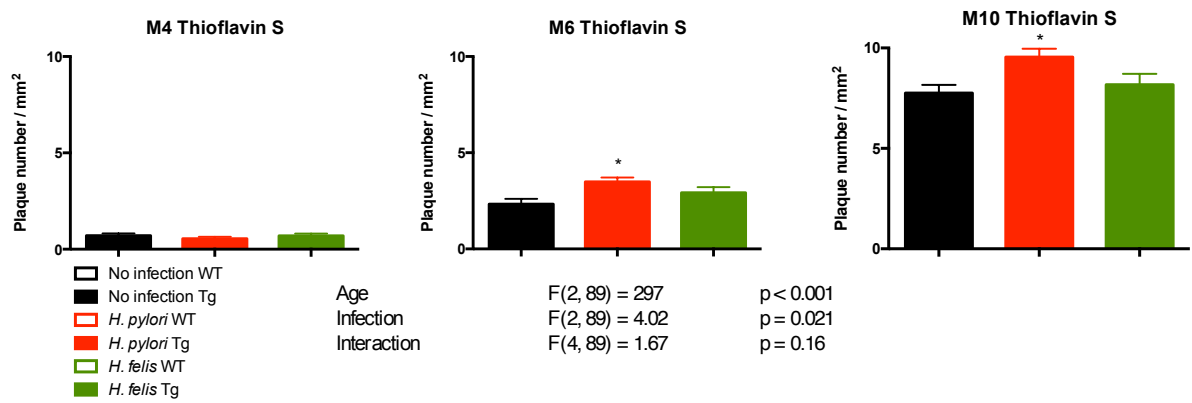


Figure 8. Amyloid load. Quantitative results of the amyloid plaques number regarding infectious status at 4, 6 and 10 months of age, * p<0.05 versus non-infected Tg mice. Error Bar: ± 1 Standard Error

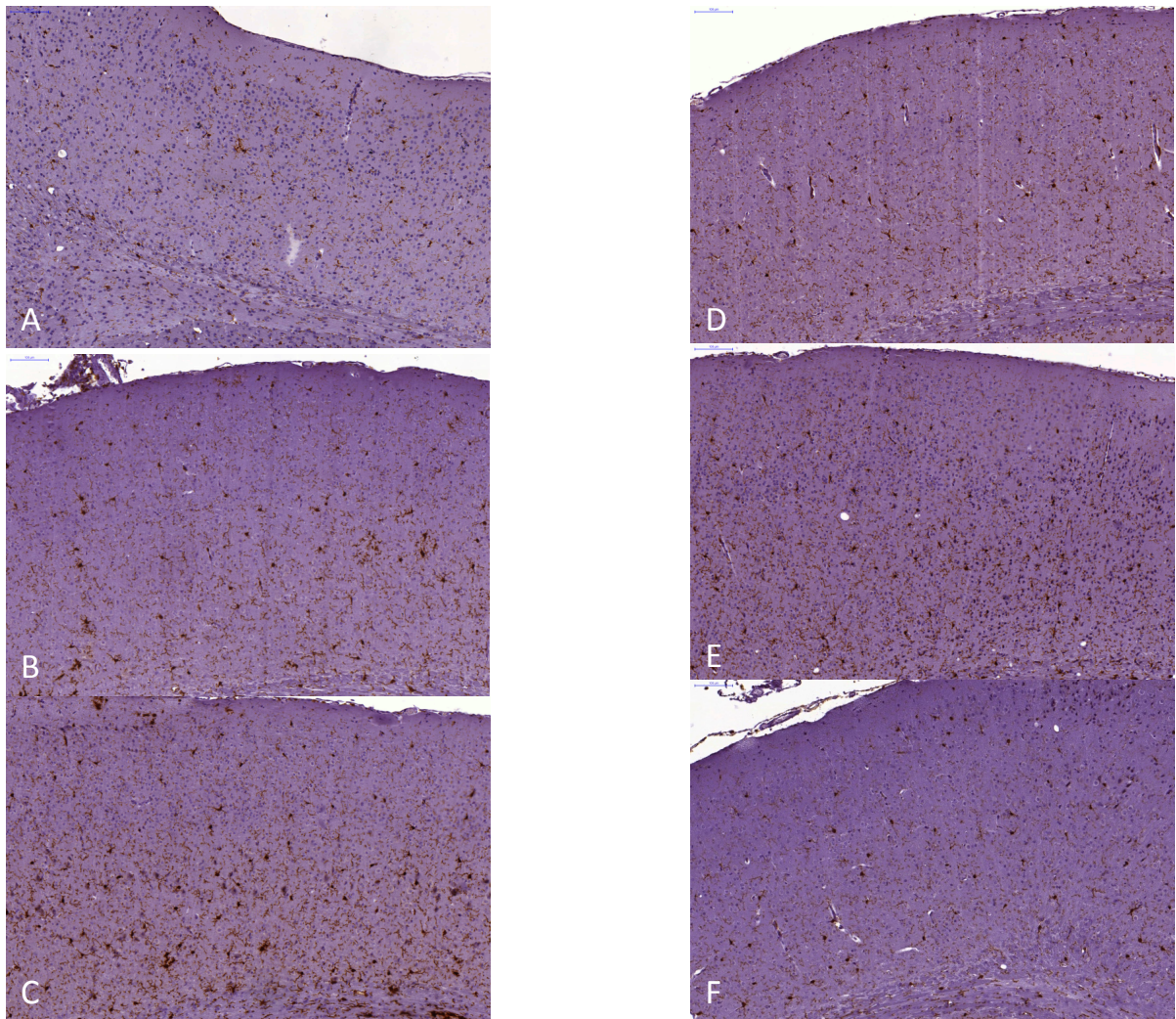


Figure 9A

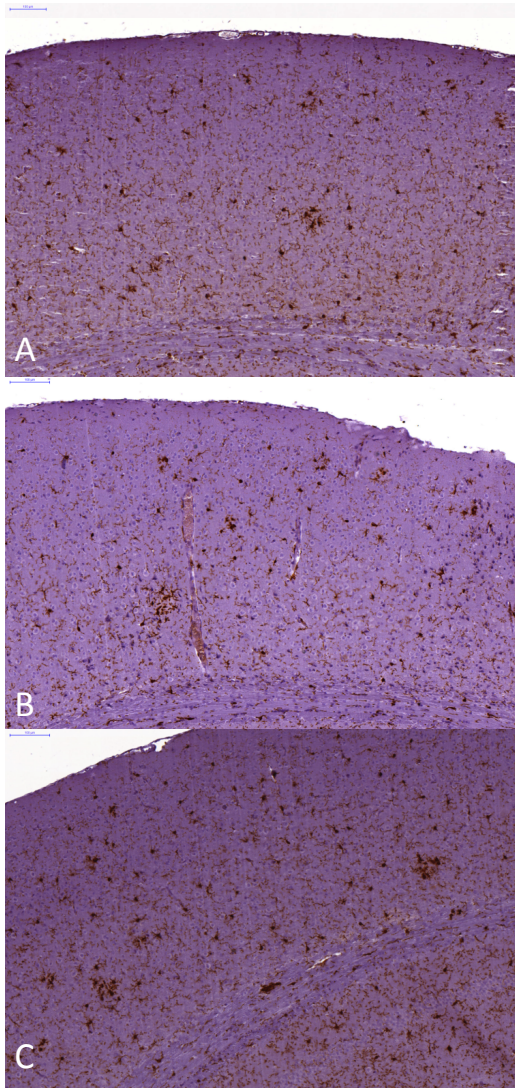
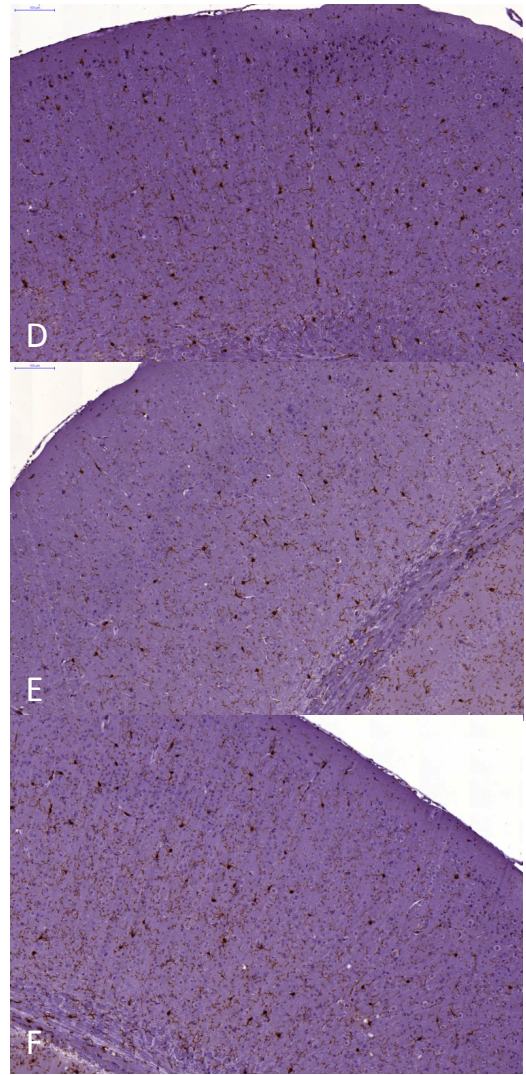


Figure 9B



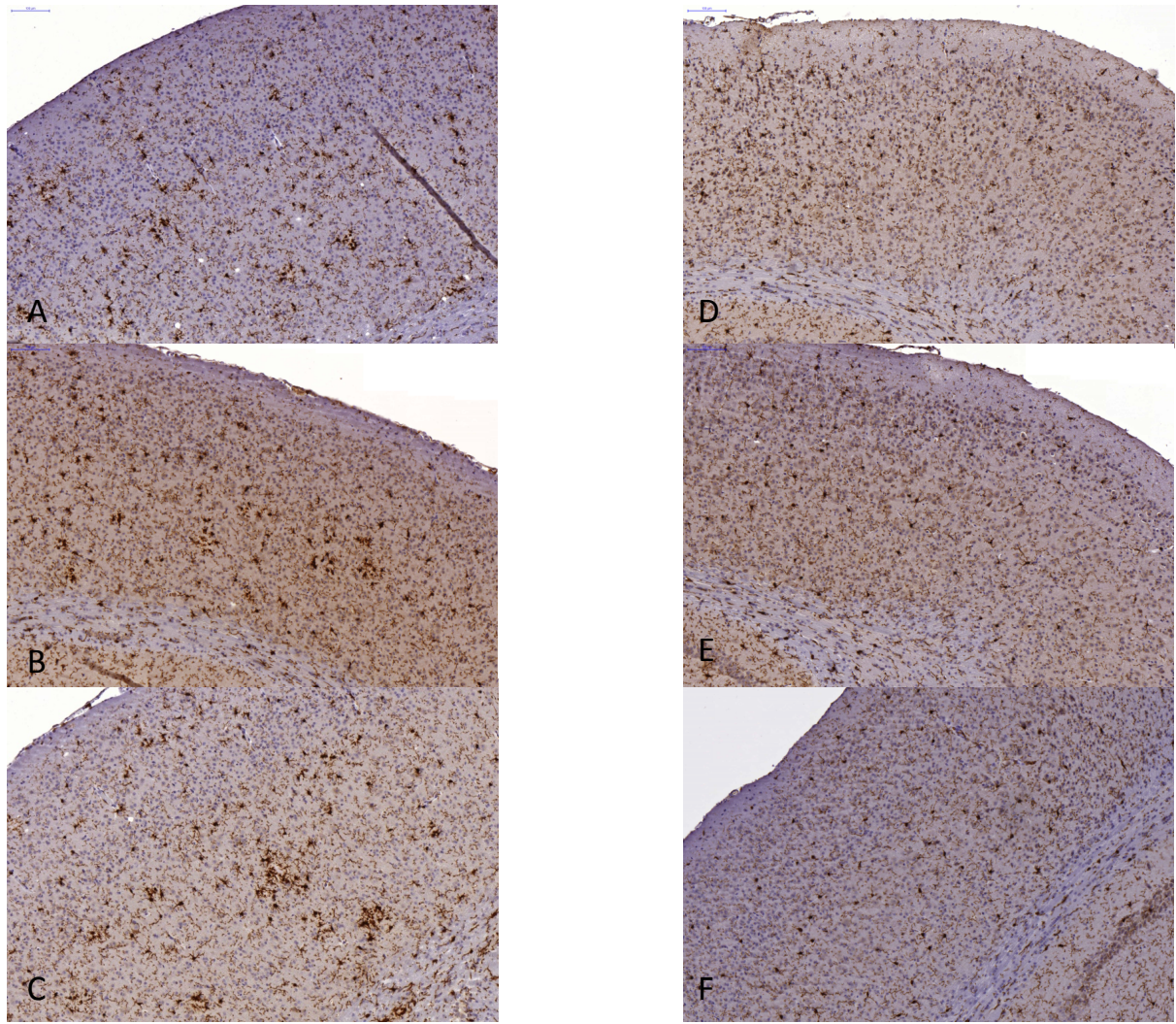


Figure 9C

Figure 9. Microglial distribution. Illustrative examples of microglial cell distribution after anti-iba-1 immunostaining of Tg (left) and WT (right) cortical brain sections of non-infected mice (A,D) and mice infected by *H. pylori* (B, E) or *H. felis* (C,F) at 4 (figure 9A), 6 (figure 9B) and 10 (figure 9C) months of age.

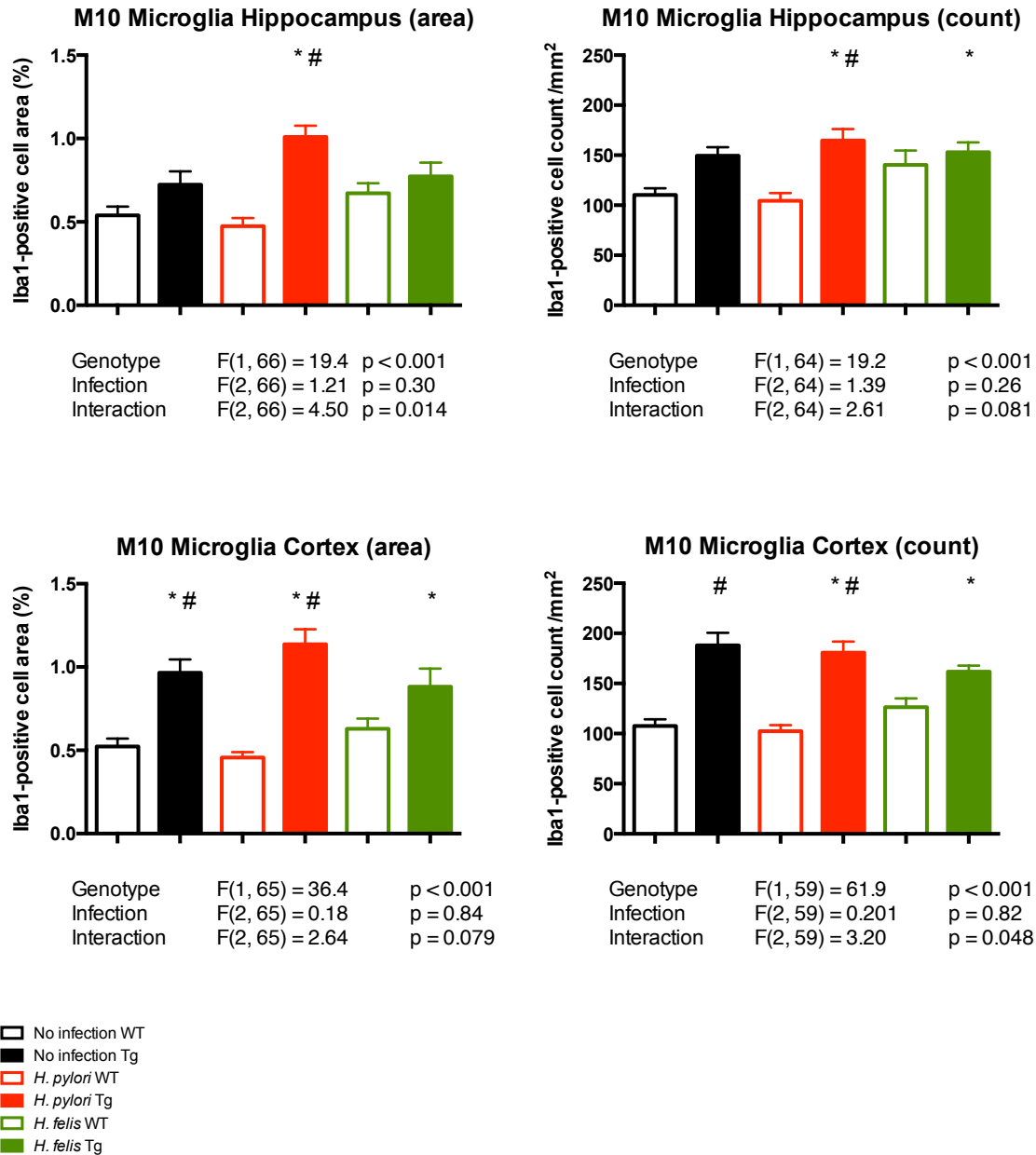


Figure 10. Microglia at 10 months of age. Hippocampal (up) and cortical (down) iba1-positive microglial cell counts and area regarding genotype and infectious status. . * $p < 0.05$ versus non-infected WT mice. # $p < 0.05$ Tg versus WT within each infection group. Error Bar: ± 1 Standard Error

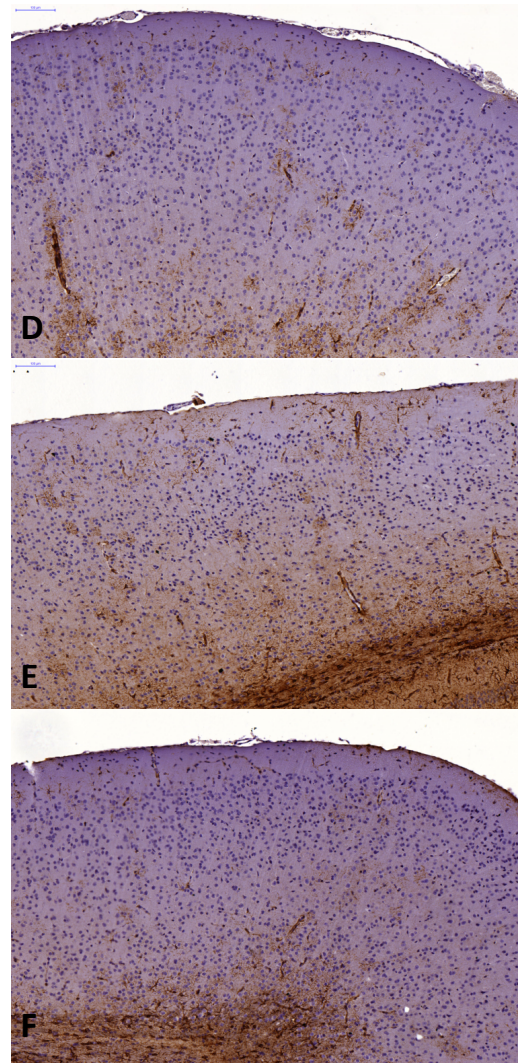
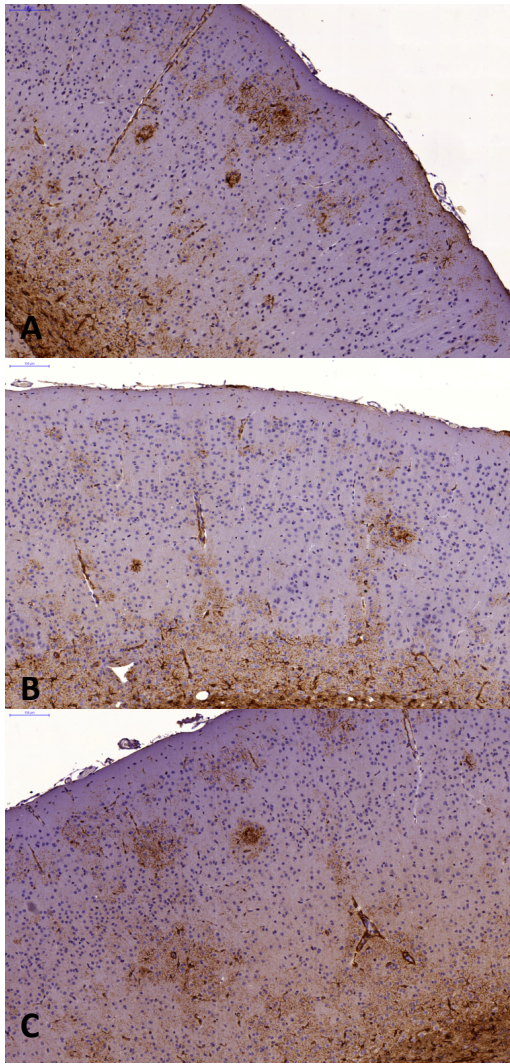


Figure 11A

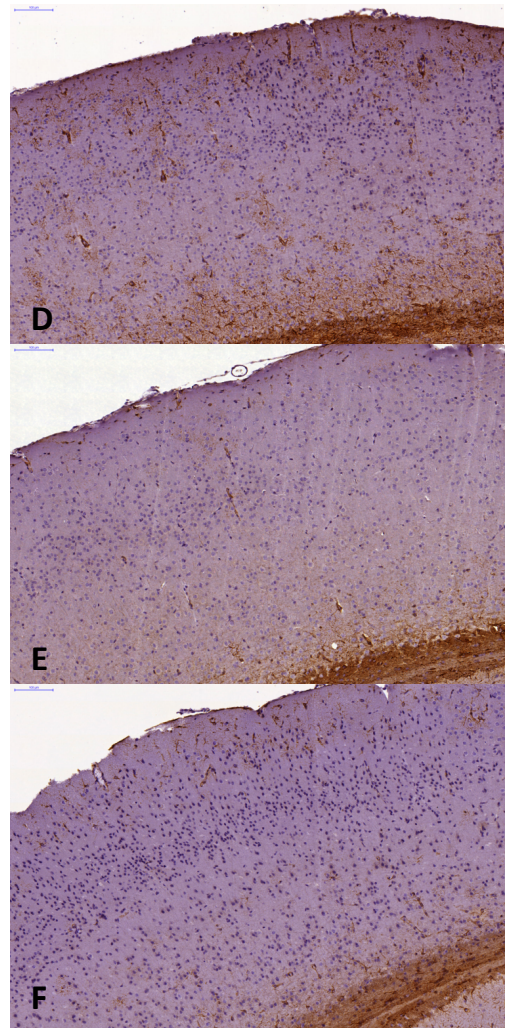
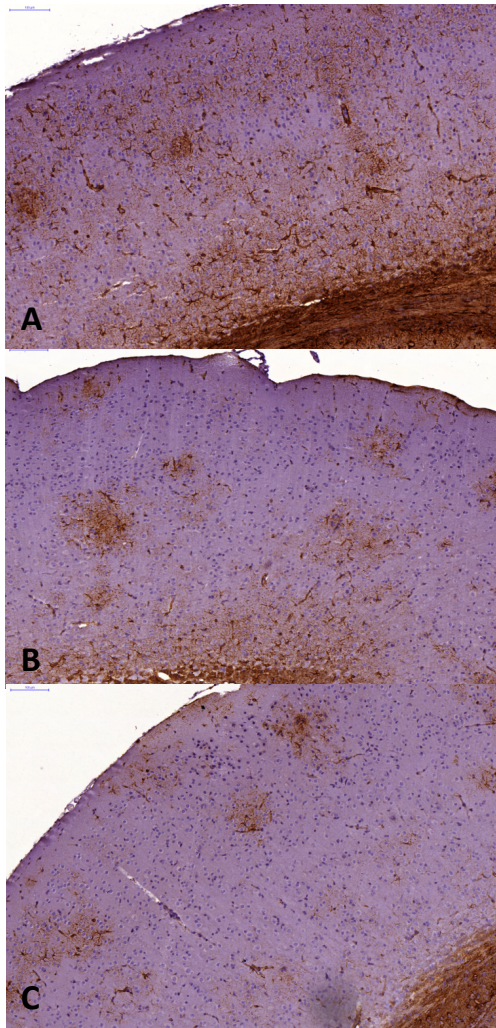


Figure 11B

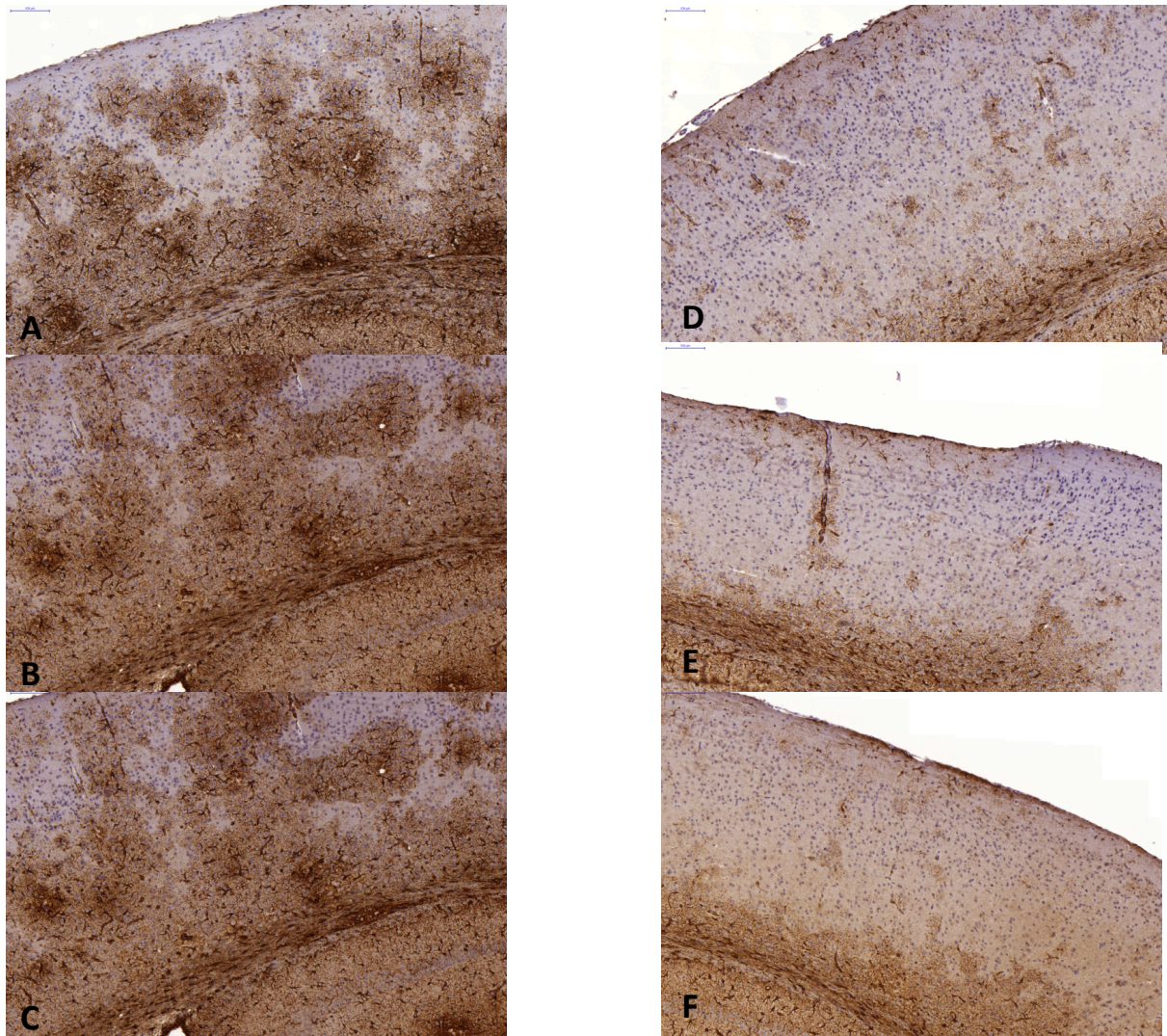


Figure 11C

Figure 11. Astrocyte distribution. Illustrative examples of astroglial cell distribution after anti-GFAP immunostaining of Tg (left) and WT (right) cortical brain sections of non-infected mice (A,D) and mice infected by *H. pylori* (B, E) or *H. felis* (C,F) at 4 (figure 11A), 6 (figure 11B) and 10 (figure 11C) months of age

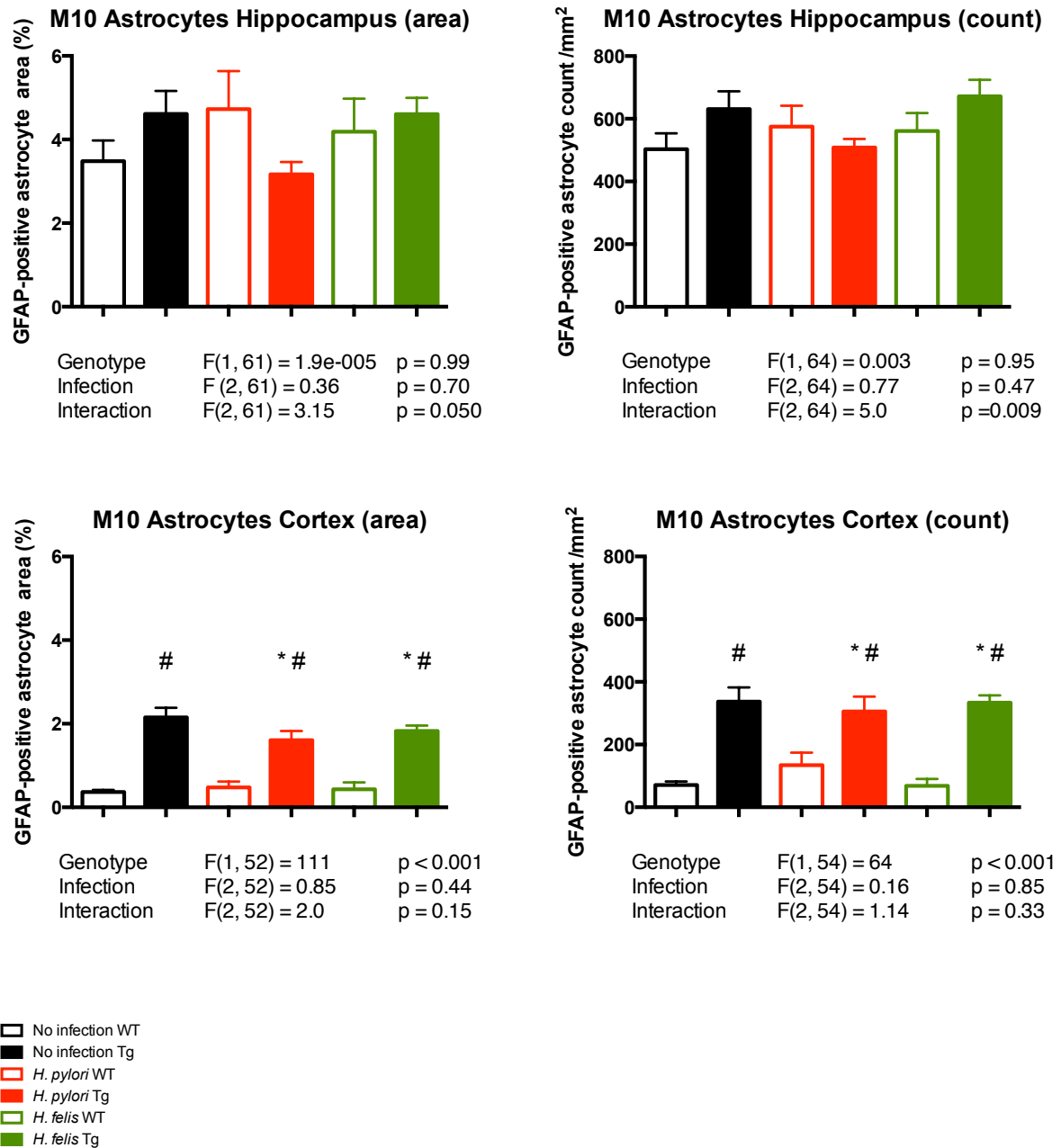
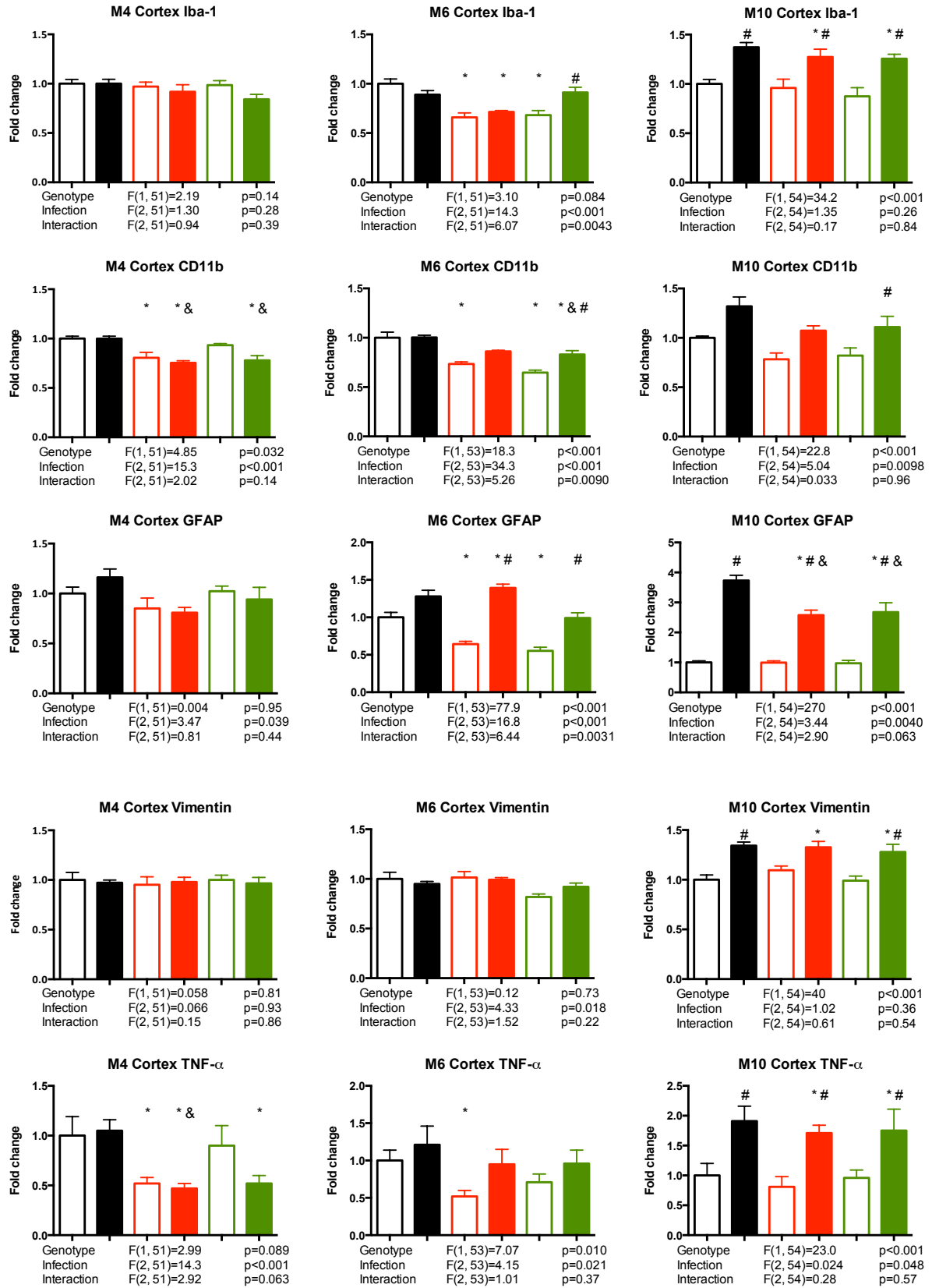
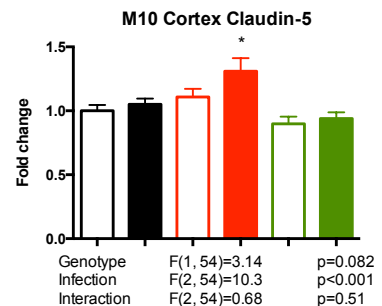
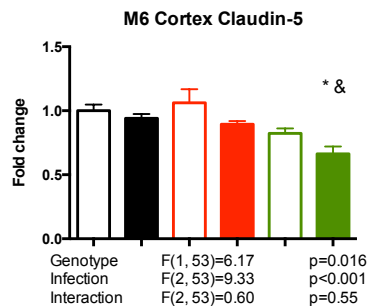
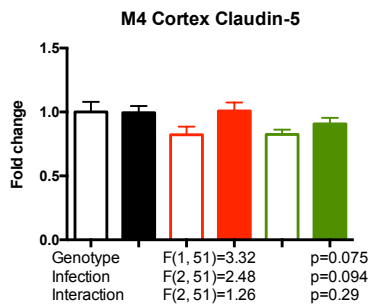
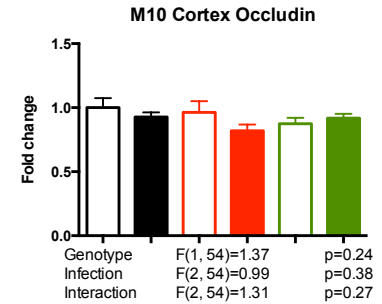
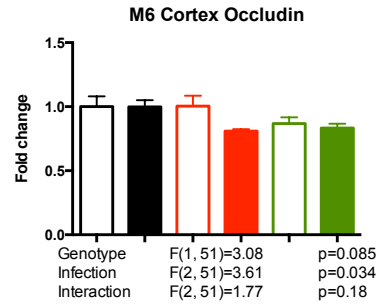
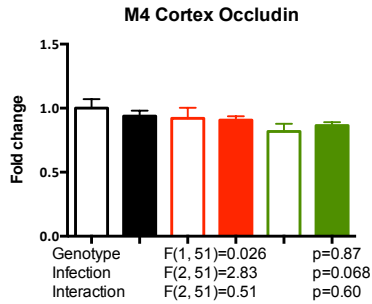
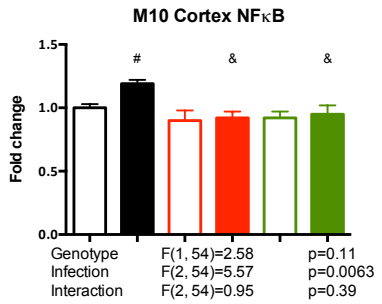
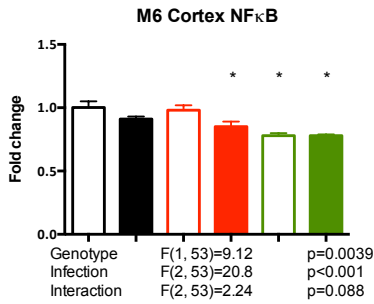
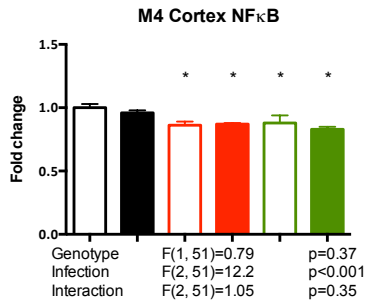
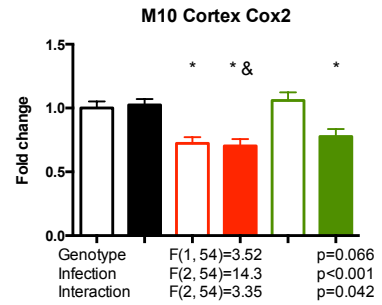
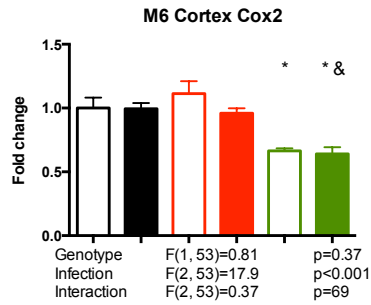
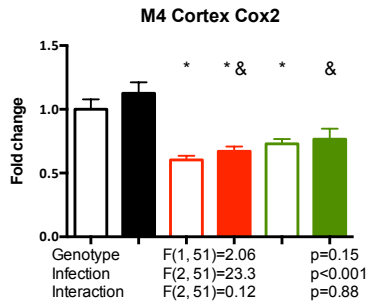
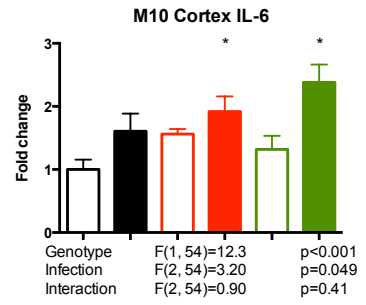
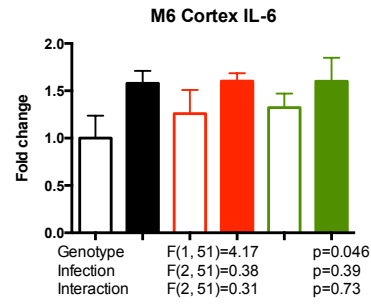
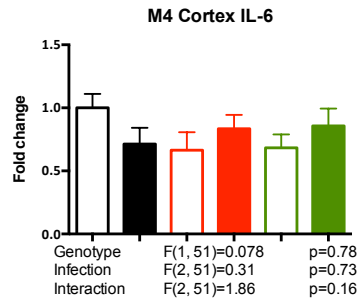


Figure 12. Astrocytes at 10 months of age. Hippocampal (up) and cortical (down) GFAP-positive astroglial cell count and area regarding genotype and infectious status. * $p < 0.05$ versus non-infected WT mice. # $p < 0.05$ Tg versus WT within each infection group. Error Bar: \pm Standard Error





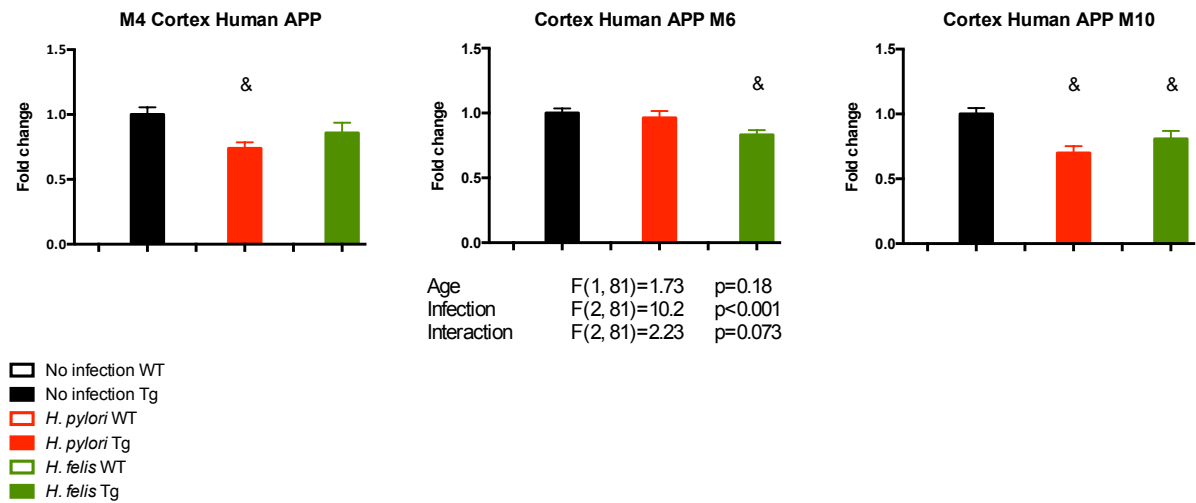
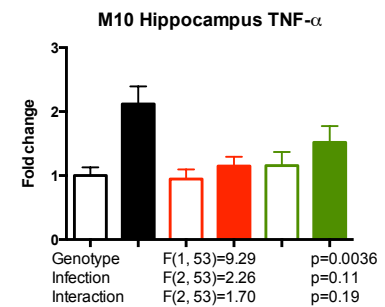
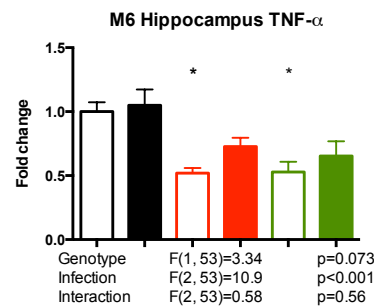
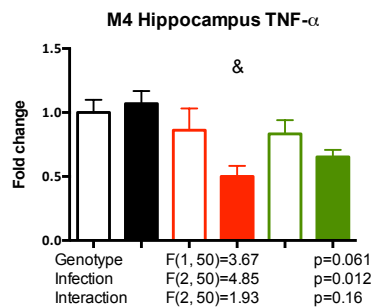
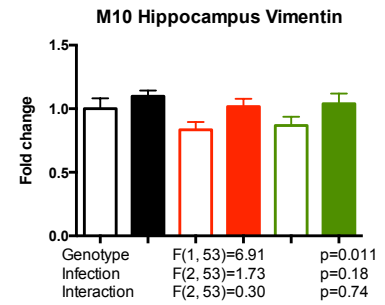
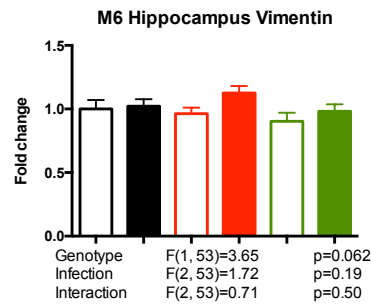
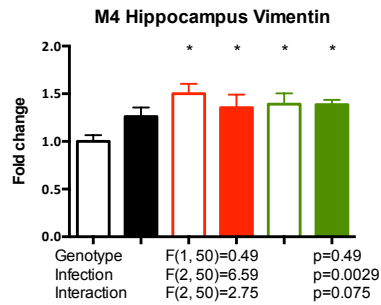
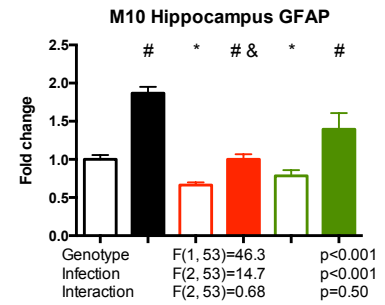
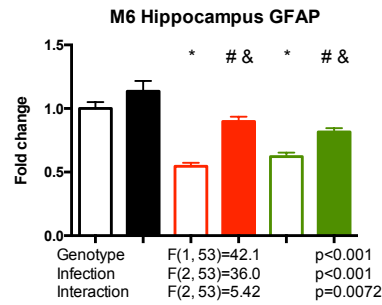
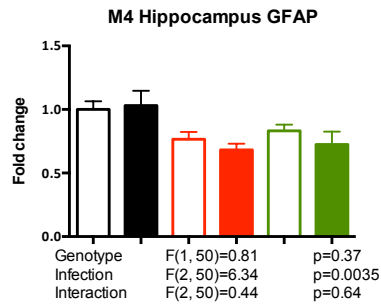
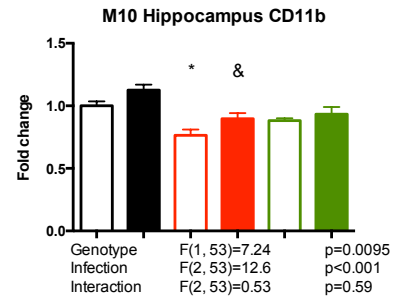
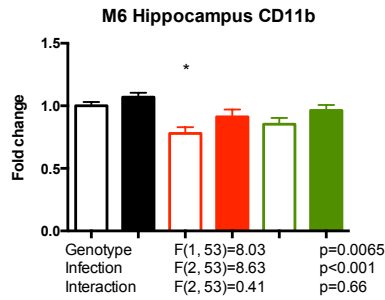
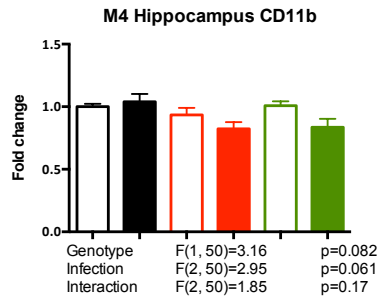
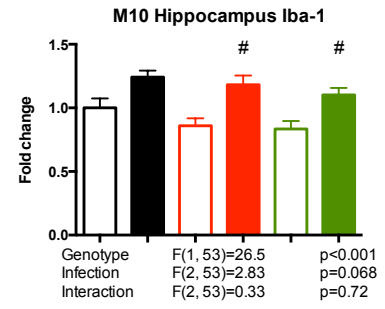
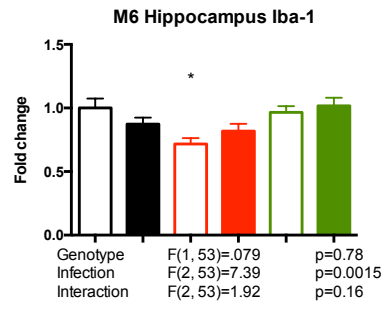
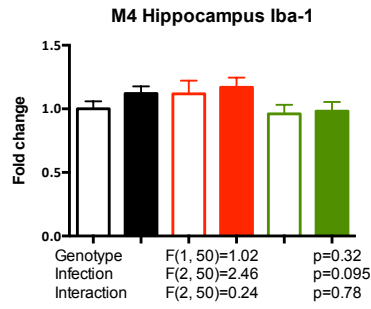
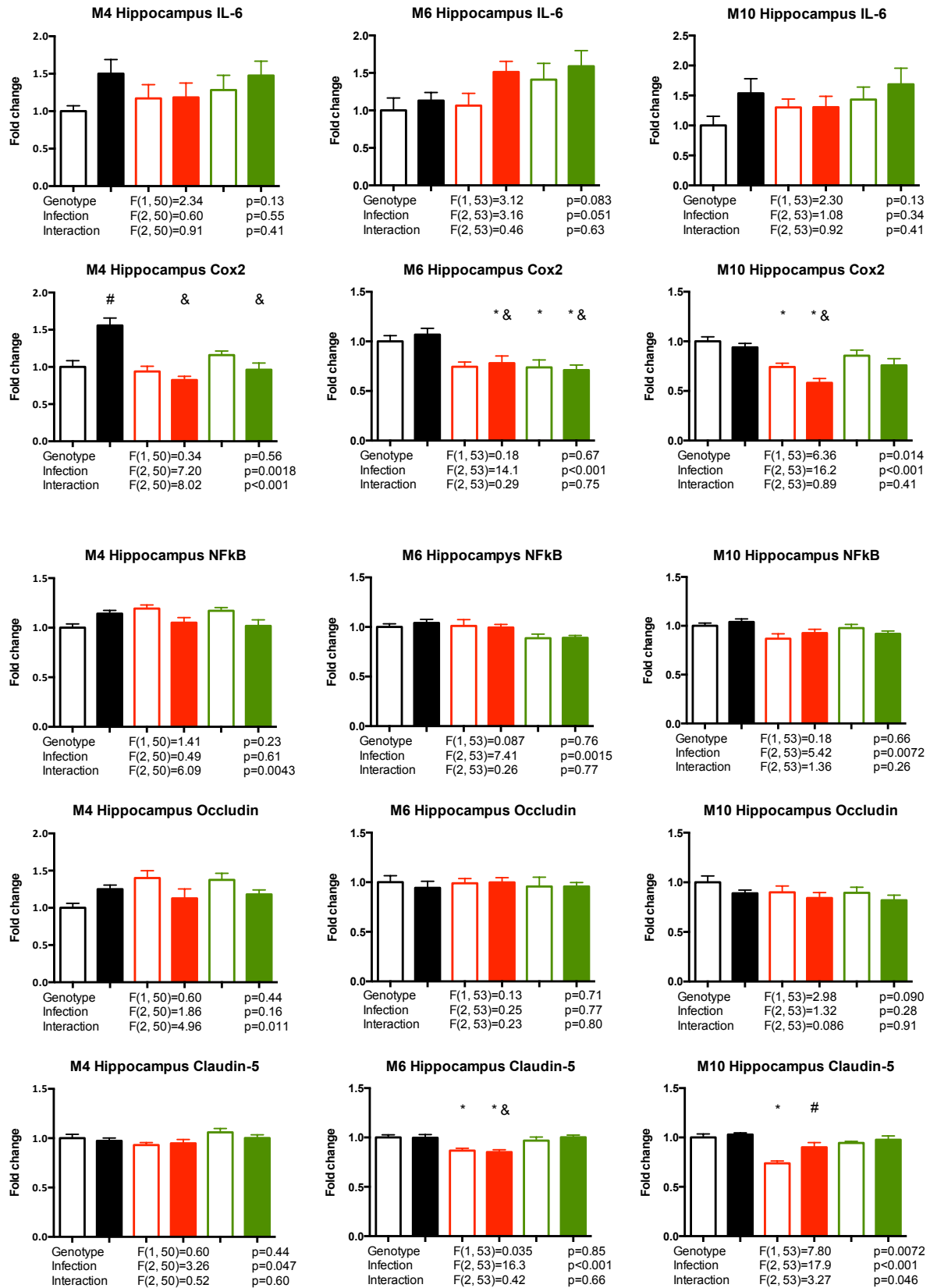


Figure 13. Quantitative real time PCR in cortex. * $p < 0.05$ non infected WT mice versus the other groups. & $p < 0.05$ *H. pylori* infected Tg and *H. felis* infected Tg versus non-infected Tg mice. # $p < 0.05$ WT versus Tg within each infection group. Error Bar: ± 1 Standard Error





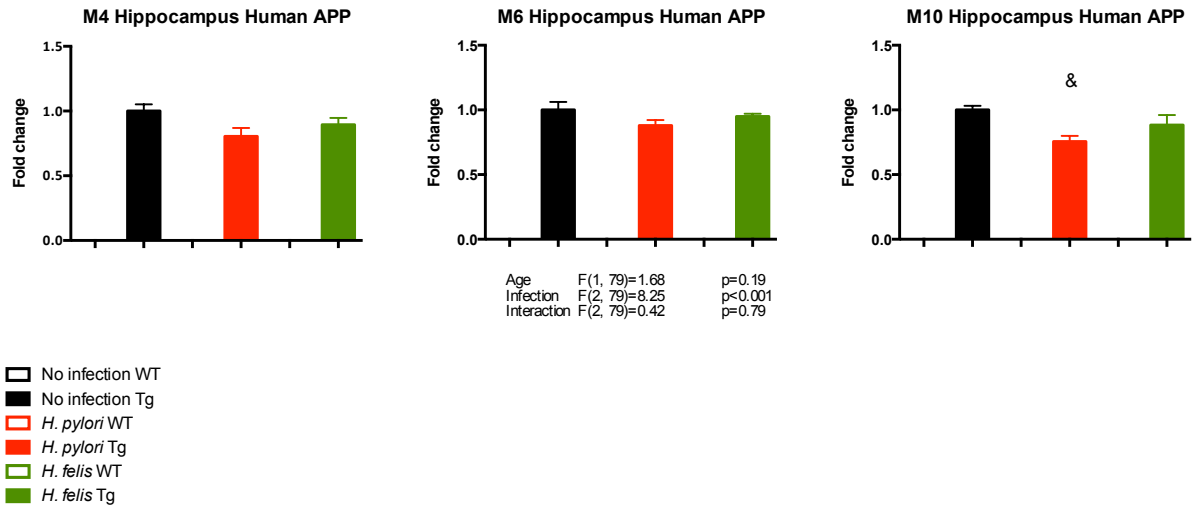


Figure 14. Quantitative real time PCR in hippocampus. * $p < 0.05$ non infected WT mice versus the other groups. & $p < 0.05$ *H. pylori* infected Tg and *H. felis* infected Tg versus non-infected Tg mice. # $p < 0.05$ WT versus Tg within each infection group. Error Bar: ± 1 Standard Error

Table 1. Primers sequences used for quantitative real time PCR.

Nom	Gene	GenBank ID	Forward Sequence (5'-3')	Reverse Sequence (5'-3')	
amyloid beta precursor protein	APP	NM_001198823	ATGACTCAGGATATGAAGTTCAT	CCTTTGTTGAACCCACATCTT	Human
Tnf alpha	Tnf	NM_013693	GGCACTCCCCAAAGATG	GCCACAAGCAGGAATGAGAAAG	Mouse
prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Ptgs2=cox2	NM_011198	AATCCTTGCTGTTCCAATCC	AGAATCCAGTCGGGTACAG	Mouse
vimentin	Vim	NM_011701	GCCAACCTTTCTCCCTGAAC	TTTGAGTGGGTGTCAACCAAGAG	Mouse
integrin alpha M (CD11b)	Itgam	NM_001082960	CTCATCACTGCTGGCCTATACAA	GCAGCTTCATTATCATGTCTCT	Mouse
translation elongation factor 1	Eef1a1	NM_010106	TGAACCATCCAGGCCAAATC	GCATGCTATGTGGGCTGTGT	Mouse
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	NM_008084	TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG	TGGAGTTGCTGTTGAAGTC	Mouse
interleukin 6	Il6	NM_031168	TACTCGGCCAAACCTAGTGCGT	ATTTTCTGACCACAGTGAGGAATG	Mouse
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	Nfkb1	NM_008689	CAAGCCCTGACAGTCCATTG	GATTTCTCAGCACCTTTGGATT	Mouse
tubulin, alpha 4A	Tuba4a	NM_009447	CTGGACCACAAGTTTGACTTGATG	TCCATTCCCTCACCCACATAC	Mouse
glial fibrillary acidic protein	Gfap	NM_010277	AGGTCGGCTTCCTGGAACA	GGGCTCCTTGCTCGAA	Mouse
succinate dehydrogenase complex subunit	Sdha	NM_023281	TACAAAGTGCAGTCGATGA	TGTTCCCAACAGGCTTCT	Mouse
occludin	Ocln	NM_008756	GGACCGGTATCATCATTTC	AGACTTAGCAAACTGCCTTAGC	Mouse
allograft inflammatory factor 1 (iba-1)	Aif1	NM_019467	CAATTCCTCGATGATCCAAATA	TTCACCTTGAAGGCTTCAAGTTT	Mouse
claudin 5	Cldn5	NM_013805	AACTGCCGGAACAGTTC	GCAGGTGCCACTGGACATTAA	Mouse

VI. DISCUSSION

La prise en charge de la perte d'autonomie induite par la maladie d'Alzheimer est un enjeu majeur de santé public pour notre siècle. Elle induit une souffrance des patients et de leurs aidants et représente un coût économique majeur. Le vieillissement de la population, secondaire à l'amélioration des conditions d'hygiène et des traitements d'autres pathologies comme les cancers et les cardiopathies, a pour conséquence un nombre croissant de patients déments. Avec le temps, il semble de plus en plus probable que cette maladie soit multifactorielle. L'hypothèse que plusieurs facteurs infectieux ou inflammatoires puissent aggraver la sévérité de la maladie d'Alzheimer est plausible à partir des différentes données de la littérature. Notre travail a consisté à approfondir les connaissances sur une association entre l'infection à *H. pylori* et la maladie d'Alzheimer.

La cohorte PAQUID explorant les facteurs de risque de démence dans une population de patients de plus de 65 ans montre, à l'inclusion, que la prévalence de la démence est augmentée et les performances cognitives diminuées en cas d'infection. Après 20 ans de suivi, l'infection à *H. pylori* est associée à une augmentation de l'incidence de démence. La maladie d'Alzheimer et l'infection à *H. pylori* ont des facteurs de risque communs, en particulier les conditions socio-économiques défavorables pendant l'enfance. Ce paramètre a pu être pris en compte lors de la réalisation des statistiques. Mais on ne peut exclure l'existence d'autres facteurs confondants entre ces deux pathologies. Les deux limites principales de cette étude sont le faible effectif de patients inclus dans l'analyse et la base du volontariat du prélèvement sanguin ; en effet les patients qui ont accepté d'avoir ce prélèvement ne sont peut être pas un échantillon représentatif de la cohorte. Depuis ces résultats, d'autres études de cohorte ont été publiées, en particulier celle de Huang *et al.* qui retrouve une augmentation de l'incidence des démences non Alzheimer lors de l'infection à *H. pylori* (132). Devant le faible effectif des démences vasculaires diagnostiquées dans la cohorte PAQUID, nous avons préféré ne pas faire de distinction parmi les démences pour l'analyse. Comme nous l'avons précisé précédemment le diagnostic de la maladie d'Alzheimer se fait maintenant sur un faisceau d'arguments cliniques et paracliniques qui n'étaient pas tous disponibles au début de la cohorte PAQUID. Toutefois, la cohorte PAQUID concerne des sujets

âgés qui développent le plus souvent des démences mixtes associant des processus neurodégénératifs et vasculaires.

L'étape suivante de notre travail a consisté à déterminer ce qui pouvait différencier, parmi les patients atteints par la maladie d'Alzheimer, ceux qui étaient infectés par *H. pylori* de ceux qui ne l'étaient pas. La sélection des patients atteints de maladie d'Alzheimer était rigoureuse car elle reposait sur plusieurs critères diagnostiques : une évaluation neuropsychologique, le dosage de biomarqueurs dans le LCR et une imagerie cérébrale. Dans cette population de patients atteints de maladie d'Alzheimer, nous avons montré que les patients infectés souffraient d'une démence plus sévère. En ce qui concerne les mécanismes sous jacents, nous n'avons pas retrouvé, en analyse multivariée, d'augmentation de marqueurs inflammatoires ou vasculaires chez les patients infectés. Les limites de cette étude sont son caractère rétrospectif, le faible nombre de patients étudiés, l'absence de patients témoins non déments et l'absence de données sur le niveau socio-économique.

A partir de ces deux études épidémiologiques où nous avons retrouvé que l'infection à *H. pylori* pouvait influencer l'évolution de la maladie d'Alzheimer en termes d'incidence et de sévérité, nous avons voulu étudier l'impact cérébral de l'infection dans un modèle animal. Nous n'avons pas retrouvé d'induction d'amyloïdopathie ou de majoration de la neuroinflammation dans le cerveau de souris sauvages infectées par deux espèces de *Helicobacter*. Le choix du fond génétique des souris de l'étude est critiquable car il n'est pas le même que celui des études de Wozniak *et al.* (326) et Little *et al.* (175) qui avaient montré un effet amyloïdogénique de HSV et *C. pneumoniae* dans le cerveau de souris BALB/c. Ces résultats histologiques n'ont pas été reproduits (38, 118, 199) quelque soit le fond génétique utilisé.

A défaut d'induire une amyloïdopathie, nous avons recherché si l'infection aggravait les troubles du comportement et les lésions cérébrales que développent des souris transgéniques prédisposées à la maladie d'Alzheimer. Cette dernière étude a montré une augmentation du nombre de plaques amyloïdes en présence d'une infection par *H. pylori* sans modification du comportement. L'évaluation cognitive des souris a été réalisée par des tests simples. Ces tests ont montré une altération cognitive des souris transgéniques, sans effet de l'infection à 10

mois. On peut expliquer ce manque de sensibilité par les conditions difficiles dans lesquelles ils ont été réalisés (sous un poste de sécurité microbiologique). Ce manque de sensibilité peut expliquer le fait que l'augmentation du nombre de plaques amyloïdes observée dans le cerveau de souris infectées par *H. pylori* ne se soit pas traduite par une altération plus importante du comportement. La neuroinflammation ne semblait pas non plus influencée par l'infection au niveau histologique, l'expression de certains gènes de l'inflammation était diminuée chez les souris infectées.

Ces premiers résultats nécessitent d'être précisés. L'analyse quantitative automatisée des plaques amyloïdes (le nombre mais aussi la surface), permettra de confirmer nos premiers résultats. La quantification de la neuroinflammation aux 4 et 6^{ème} mois et de l'inflammation gastrique aux 6 et 10^{ème} mois compléteront également ce travail. Nous pourrons ainsi réaliser des analyses statistiques complémentaires, en particulier la recherche de corrélations entre l'inflammation gastrique, la neuroinflammation, les plaques amyloïdes et les troubles du comportement. Un dosage de cytokines pro-inflammatoires dans le sérum des souris permettra d'évaluer la présence d'une inflammation systémique induite par l'infection à *Helicobacter* spp.

Les perspectives de ce travail concerne tout d'abord la poursuite de notre collaboration avec l'équipe de Jean-François Dartigues à l'ISPED, d'une part sur le suivi à 25 ans de la cohorte PAQUID, et d'autre part sur un nouveau projet de recherche avec la cohorte AMI. Cette dernière est constituée de 1002 retraités du monde agricole âgés de plus de 65 ans, résidant dans des communes rurales de Gironde. L'objectif global de la cohorte est d'étudier les maladies liées à l'âge, avec un intérêt tout particulier pour les démences. Le démarrage de la cohorte a eu lieu en 2007, trois phases de suivi ont été réalisées à ce jour, avec des visites effectuées au domicile des participants. De nombreuses variables ont été recueillies : sociodémographiques, environnement social, matériel et géographique, habitudes de vie, tests neuropsychologiques, antécédents médicaux. Comme pour la cohorte PAQUID, les patients bénéficient d'une batterie de tests neuropsychologiques et d'une évaluation par un gériatre (au domicile) en cas de suspicion de démence. D'autre part, à l'inclusion, un prélèvement sanguin a été réalisé pour les 696 personnes l'ayant accepté. Un bilan biologique standard a été effectué et une bibliothèque a été constituée. La cohorte s'est enrichie également d'IRM cérébrales pour plus de 300 personnes, le génotypage de plusieurs gènes à

risque suspectés dans la maladie d'Alzheimer a été réalisé. L'objectif principal de notre étude est d'explorer les 3 pistes infectieuses dans la démence - infection à Herpès Simplex Virus, infection à *Helicobacter pylori* et Borréliose de Lyme à partir du sérum des patients. L'étude est en cours et les premiers résultats devraient être disponibles dans les mois qui viennent. Cette approche « multi-pathogènes », à l'image de l'étude réalisée par Katan *et al.* (149) est très intéressante. En effet si chacun des pathogènes a une influence modérée voire minime sur l'évolution de la maladie d'Alzheimer, on peut imaginer que l'impact cognitif de l'accumulation de ces différentes pathologies infectieuses devrait être plus aisé à mettre en évidence. Les IRM cérébrales permettront d'apporter des données sur les lésions vasculaires associées à la maladie d'Alzheimer et de voir si elles sont augmentées en cas d'infection. Le génotype de l'Apolipoprotéine permettra d'étudier la potentialisation des effets des différentes infections par la présence de l'allèle ε4.

Parallèlement à la poursuite de cette approche épidémiologique, d'autres études expérimentales sont nécessaires. Dans notre étude sur les souris Tg, nous avons retrouvé que l'expression de certains gènes de l'inflammation était significativement diminuée dans le cerveau des souris infectées par *H. felis* et *H. pylori*. Il semble donc exister une modulation de la neuroinflammation associée à l'infection qui nécessite d'être mieux comprise. On ne retrouve pas, dans notre étude, d'augmentation du nombre des astrocytes et des cellules microgliales et de la surface qu'ils occupent dans le cerveau des souris infectées, en revanche il existe une diminution de l'expression de certains gènes comme celui du TNF-α (cytokine pro-inflammatoire), de iba-1 (marqueur des cellules microgliales) ou encore de GFAP (marqueur des astrocytes). Alors que nous nous attendions à une augmentation de l'expression de ces gènes, nous n'avons pas d'explication très précise à ces résultats. On peut toutefois émettre l'hypothèse que l'infection serait associée à une modification du statut fonctionnel des cellules de la neuroinflammation. Le rôle bénéfique ou délétère de l'activation de la neuroinflammation n'est pas encore clair dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer et la dysfonction des cellules microgliales (l'altération de la dégradation des plaques amyloïdes par exemple) (338) pourrait être influencée par l'inflammation systémique induite par *H. pylori*. Dans notre étude le nombre de plaques amyloïdes est augmenté par l'infection alors que le taux d'ARN messagers de *app humain* est diminué, ce qui pourrait être

en faveur d'une altération de la clairance du peptide A β . Ces premiers résultats pourraient faire l'objet de recherches complémentaires.

En plus des plaques amyloïdes et de la présence de la neuroinflammation, l'anatomopathologie de la maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence de dégénérescences neurofibrillaires. D'ailleurs, dans l'étude collaborative avec Pierre Krolak-Salmon, les patients atteints de maladie d'Alzheimer infectés par *H. pylori* avaient des taux de protéines Tau totales et Tau phosphorylées plus élevés que les patients non infectés. Nous n'avons pas étudié ce phénomène dans nos deux études animales. L'utilisation d'un modèle animal capable de développer une taupathie pourrait être une prochaine étape pour mieux comprendre l'impact de l'infection sur la maladie d'Alzheimer.

Enfin, si d'autres études apportent des arguments en faveur d'une aggravation de la démence par l'infection, une étude d'intervention randomisée contre placebo évaluant l'impact du traitement de l'infection sur le déclin cognitif de patients déments infectés serait une étape importante.

Ce travail de thèse même s'il ne permet pas de conclure définitivement sur la présence ou l'absence d'une association entre les 2 pathologies, a utilisé plusieurs approches pour mieux la comprendre : deux études épidémiologiques et deux études animales étudiant le comportement et les lésions cérébrales de souris infectées. Ce travail a été à l'origine de plusieurs collaborations riches d'enseignements et a permis d'apporter de nouvelles informations sur l'hypothèse infectieuse de la maladie d'Alzheimer. A défaut d'être un facteur étiologique de la maladie d'Alzheimer, *H. pylori* pourrait être un facteur d'aggravation de la maladie. D'autres études sont toutefois nécessaires pour répondre à la présence d'une association ou non et pour déterminer les mécanismes sous jacents.

VII. ANNEXES

Annexe 1. Roubaud Baudron C, Franceschi F, Salles N, Gasbarrini A. Extragastric diseases and *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2013 Sep;18 Suppl 1:44-51

REVIEW ARTICLE

Extragastric Diseases and *Helicobacter pylori*

Claire Roubaud Baudron^{*,†,‡} Francesco Franceschi[§] Nathalie Salles^{*,†,‡} and Antonio Gasbarrini[¶]

*Université de Bordeaux, Laboratoire de Bactériologie, Bordeaux, France, [†]Pôle de Gériatologie Clinique, Bordeaux, France, [‡]INSERM U853, Bordeaux, France, [§]Internal Medicine, Catholic University of Rome, Rome, Italy, [¶]Department of Gastroenterology, Catholic University of Rome, Rome, Italy

Keywords

CagA, inflammation, sideropenic anemia, ITP, hepatobiliary diseases, neurologic disorders, Alzheimer disease.

Reprint request to: Antonio Gasbarrini, Internal Medicine and Gastroenterology, Catholic University of Rome, Policlinico A. Gemelli, Largo A. Gemelli, 8 – 00168 Rome, Italy.
E-mail: agasbarrini@rm.unicatt.it

Abstract

In the last year, several diseases from outside of the gastrointestinal tract have been associated with *Helicobacter pylori* infection. Indeed, this bacterium produces a low-grade inflammatory state, induces molecular mimicry mechanisms, and interferes with the absorbance of nutrients and drugs possibly influencing the occurrence or the evolution of many diseases. In addition to its role in some hematologic conditions, such as immune thrombocytopenic purpura, idiopathic sideropenic anemia, and vitamin B12 deficiency, which were included in the current guidelines, several other conditions such as cardiovascular diseases, diabetes mellitus, hepatobiliary diseases, and neurologic disorders have also shown promising results.

Helicobacter pylori may be considered as the most common infectious pathogen of the gastroduodenal tract, but it is also one of the best models of infectious disease. This is mainly due to the fact that determinants of virulence and pathogenicity have been largely studied and this allowed researchers to correlate their expression not only with different diseases of the gastroduodenal tract but also with disorders outside of the stomach [1]. Indeed, this bacterium produces a low-grade inflammatory state, induces molecular mimicry mechanisms, and interferes with the absorbance of nutrients and drugs, possibly influencing the occurrence and/or the evolution of many diseases [2]. In this article, the most recent findings on the role of *H. pylori* infection in different extragastric diseases will be reviewed.

Cardiovascular Diseases

Despite the great number of studies published so far in this field, the role of *H. pylori* infection and/or CagA-positive strains still remains controversial. In a recent study on 433 patients, Eskandarian et al. [3] showed that seropositivity for *H. pylori* was significantly associated with a risk of short-term adverse outcome in patients with acute coronary syndromes. On the other hand, Schöttker et al. [4] found an inverse relationship of CagA-positive *H. pylori* strains with fatal

cardiovascular events. Similarly, Grub et al. [5] did not find an association between chronic infections and coronary artery disease in patients with inflammatory rheumatic diseases. Based on these results, the association between *H. pylori* infection and ischemic heart disease remains uncertain, as some studies support the previously demonstrated hypothesis, while others show no relationship [2,6].

Concerning ischemic stroke, Chen et al. [7] reported a positive association between *H. pylori* infection, interleukine (IL)-18, and carotid intima-media thickness, while Longo-Mbenza et al. [8] demonstrated an association between known cardiovascular risk factors, carotid plaque, stroke, and *H. pylori* infection. Finally, a study by Izadi et al. [9] showed that *Helicobacter* species may replicate in the coronary arterial wall, and so, *H. pylori* may increase levels of total cholesterol and LDL.

Diabetes Mellitus

In a recent study, Zhou et al. [10] found a high prevalence of *H. pylori* infection in patients with diabetes mellitus (DM), especially Type 2. Similar results were reported by Jeon et al. [11] who analyzed sera from 782 individuals over age 60 years. Interestingly, some authors such as Shin et al. [12] also proposed a role of *H. pylori* in the occurrence of the metabolic syndrome.

On this subject, a recent study by Chen et al. [13] reported the presence of a synergistic interaction between *H. pylori* and higher body mass index (BMI) in increasing the level of glycosylated hemoglobin, while Akanuma et al. [14] demonstrated that *H. pylori* eradication significantly increased BMI but not glycosylated hemoglobin. Moreover, *H. pylori* seropositivity is significantly associated with both DM and insulin use, as demonstrated by Tseng [15], while patients with type 1 DM showed high reinfection rates compared to nondiabetic patients, according to Candelli et al. [16]. Chung et al. [17] showed that *H. pylori* positivity is independently associated with microalbuminuria and significantly increases the severity of the urinary albumin to creatinin ratio. On the other hand, the prevalence of *H. pylori* was similar in patients with type 2 DM and in controls, in a study performed in Nigeria, thus contesting the association [18].

Hematologic Diseases

Sideropenic Anemia

The role of *H. pylori* in the pathogenesis of iron-deficiency anemia (IDA) is well recognized. Xia et al. [19] clearly showed that IDA is strongly associated with *H. pylori* infection and that *H. pylori* eradication determines a more rapid response to oral iron therapy. Interestingly, a study conducted on Mexican schoolchildren reported that children with anemia or iron deficiency showed a higher infection acquisition rate than those with a normal iron nutritional status [20]. Several studies have been performed to identify the mechanisms behind this association. Wang et al. [21] showed that the iron content of erythrocytes exposed to *H. pylori* for 4 hours decreased significantly and that *H. pylori* is able to adhere more strongly to group A erythrocytes, thus explaining why blood patients with group A are more susceptible to both IDA and *H. pylori* infection. Indeed, *H. pylori* is able to increase the oxidative stress in patients with an active infection, as demonstrated by the high level of malondialdehyde and low level of ferritin in infected children or in adults [22]. Interestingly, others reported a positive association between the presence of an *H. pylori* strain with Thr70-type NapA and iron uptake, thus demonstrating that not all *H. pylori* strains are able to use the same amount of iron [23].

Idiopathic Thrombocytopenic Purpura

Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is another universally accepted extragastric manifestation of *H. pylori* infection. Hasni found that among different

autoimmune diseases, ITP is the one in which *H. pylori* infection should always be investigated [24]. Similarly, Payandeh et al. [25] clearly showed how *H. pylori* infection plays a consistent role in determining ITP, especially in patients with mild thrombocytopenia. Concerning the pathogenic mechanisms, besides molecular mimicry [26], *H. pylori* eradication has been shown to increase the number of plasmacytoid dendritic cells only in responders as demonstrated by Saito et al. [27], while liver-to-spleen, platelet-to-spleen, mean platelet volume (MPV)-to-spleen, and MPV-to-liver ratios were found to be significantly lower in patients with *H. pylori* infection compared to controls, possibly playing a role in thrombocytopenia [28].

Autoimmune Diseases

A positive association was found between both *H. pylori* seroprevalence and CagA-positive strains in patients with autoimmune thyroid diseases [29]. In a study on 1290 patients diagnosed with 14 different autoimmune diseases, Ram et al. [30] reported a positive association between *H. pylori* infection and antiphospholipid syndrome, giant cell arteritis, systemic sclerosis, and primary biliary cirrhosis.

Respiratory Diseases

Many researchers in the past have proposed an inverse relation between *H. pylori* infection and asthma. A meta-analysis found that asthmatic patients have a significantly lower prevalence of *H. pylori* infection than controls [31]. Even though, in some studies such as that of Wang et al. [32], the negative association is weak, and we know that the prevalence of *H. pylori* infection in patients with asthma does not increase [33]. Concerning the pathogenic mechanisms behind the supposed protective effect, Oertli et al. [34] clearly showed how *H. pylori* is able to stimulate the Th1 immune response, promoting persistent infection but conferring protection against asthma. Finally, Siva et al. [35] found a positive association between *H. pylori* infection, peptic ulcer, and chronic obstructive pulmonary disease, as described in the past by other authors.

Dermatological Diseases

Magen et al. [36], in a retrospective study, reported that chronic spontaneous urticaria may be triggered by *H. pylori* eradication, while El-Khalawany et al. [37], who studied 68 patients with rosacea and 54 controls, found that *H. pylori* infection played a significant role in rosacea patients who experienced dyspeptic

symptoms, especially those with the papulopustular manifestations.

Hepatobiliary Diseases

Gallbladder cancer remains a rare gastrointestinal malignancy with a multifactorial pathophysiology. *Helicobacter* spp. gallbladder infection inducing local chronic inflammation and gallstone formation could be associated with an increased risk of developing gallbladder cancer. Several studies published this year confirmed this hypothesis. In a meta-analysis including 10 studies published between 2002 and 2011, Zhou et al. explored the association between *Helicobacter* spp. (*H. pylori*, *H. bilis*, *H. hepaticus*, and *H. ganmani*) infection and biliary tract cancer specimen analysis using PCR and immunohistochemistry on bile and biliary tissues. They suggested a trend toward a higher prevalence of *Helicobacter* spp. in patients with biliary tract cancers compared with normal controls or those with benign biliary diseases [38]. Mishra et al. [39] detected *H. pylori* DNA in 33% (18/54) of gallbladder cancer tissues associated with a significantly increased level of cytokines IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α compared to *H. pylori*-negative tissue specimen. Alexander et al. conducted a retrospective population-based study to evaluate trends in the incidence and treatment of gallbladder cancer in the past three decades in the south of the Netherlands. During this time period, the age-standardized incidence of gallbladder cancer declined drastically, probably because of an increasing number of early cholecystectomies for gallstones, but also perhaps because of the effective treatment of *H. pylori* which also paralleled the decreasing incidence of stomach cancer [40]. Boonyanugomol et al. published three studies this year investigating the association between *Helicobacter* spp., especially virulent strains, and hepatobiliary pathologies. The first one [41] showed that *H. pylori* DNA detected by PCR was significantly more prevalent in patients with cholangiocarcinoma than in controls, especially CagA-positive *H. pylori* strains. This increased prevalence was associated with a more pronounced cell proliferation (Ki-67 immunochemistry). The second study [42] investigated *H. pylori* virulence-associated genes, that is, *vacA*, *iceA*, *babA2*, *cagA*, and *cagE* in hepatobiliary diseases (i.e., cholangiocarcinoma/cholelithiasis) and controls. The *vacAs1a+c/m1*, *iceA1*, and *babA2* genes were the most predominant genotypes in both diseases. *H. pylori* strains, especially *cagA* and *CagE*, were more frequently detected in patients with cholangiocarcinoma than those with cholelithiasis or the controls. Their last study [43] showed the ability of *H. pylori* γ -glutamyl-

transpeptidase (GGT) to induce apoptosis and IL-8 production in a human cholangiocarcinoma cell line. *H. pylori* infection could participate in the development of cancer in hepatobiliary cells by altering cell kinetics and promoting inflammation.

Shapira et al. explored the possible involvement of the environmental factors in primary biliary cirrhosis. They compared sera IgG antibodies against *Toxoplasma gondii*, *H. pylori*, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, hepatitis B, and hepatitis C viruses from patients with primary biliary cirrhosis and controls. *H. pylori* seroprevalence (54 vs 31%, respectively, $p < .01$), among others, was higher in patients with primary biliary cirrhosis than in the control group. The authors suggested that multiple exposures to infectious agents may contribute to primary biliary cirrhosis risk [44].

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the leading causes of cancer-related deaths worldwide. The discovery of *H. hepaticus* as a causal agent of hepatitis and hepatocellular carcinoma in mice has stimulated interest in looking for *Helicobacter* spp. in human liver samples. Moreover, *Helicobacter* spp. have been implicated as cofactors in the progression of chronic viral hepatitis to cirrhosis and HCCs. In fact, *Helicobacter* spp. DNA was detected in tissue specimens from patients suffering from hepatitis C virus (HCV)-induced HCC; the DNA prevalence increased with the severity of the disease. *Helicobacter* spp. infection could contribute to the progression from cirrhosis to HCV-induced neoplasia. Esmat et al. also searched for an association between *H. pylori* and HCV-related liver disease in 85 patients according to liver pathology (METAVIR system). In this study, the positivity of *H. pylori* DNA (*cagA* gene) in liver tissue was directly proportional to the severity of the liver pathology, but no association between *H. pylori* PCR and quantitative HCV RNA was found. Authors concluded that there may be an association between the presence of *H. pylori* (*cagA* gene) in the liver and disease progression in HCV-related chronic hepatitis and cirrhosis with and without HCC [45]. Okoli et al., using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, investigated protein expression in Huh7 cells harboring an HCV replicon, and in replicon cured Huh7 cells cocultured with *H. bilis*. They reported that *H. bilis* affected the modulation of proteins implicated in different pathways of Huh7-derived cell physiology including the progression from dysplasia to neoplasia; this modulation was different whether the HCV replicon was present or not [46]. Krüttgen et al. [47] studied the link between *H. hepaticus* and HCC by screening stool samples from patients with viral-induced HCC (hepatitis B or C) and found no association.

The synergism between HCV and *H. hepaticus* infection was tested in transgenic mice with a more sensitive genetic background to *H. hepaticus* infection. They found that *H. hepaticus*, but not the HCV transgene, increased the number of hepatic lesions. The effect of the mouse genetic background was greater than the effect of the HCV transgene on the number of hepatic lesions and was sufficient to promote lesions particularly via its sensitivity to *H. hepaticus* infection. The synergism between HCV and *H. hepaticus* infection involved in liver disease may be highly host dependent [48].

In a metaanalysis comprised of nine studies (5 non-randomized control studies and 4 before-after studies) with 699 cirrhotic patients, Qin et al. [49] found no effect of *H. pylori* eradication on blood ammonia levels.

Apart from the usual risk factors, *H. pylori* infection has been recently proposed as a possible pathogenic factor of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Polyzos et al. showed that *H. pylori* infection seroprevalence was higher in NAFLD patients compared to controls. Both *H. pylori* infection (previous *H. pylori* eradication treatment and/or *H. pylori* IgG seropositivity) and insulin resistance could predict NAFLD independently. *H. pylori* infection was not associated with the severity of the disease [50].

Neurologic Disorders

Even after extensive investigations, causes of idiopathic seizure or neurologic autoimmune diseases have not been found, therefore *H. pylori* infection, by inducing a chronic systemic inflammation could participate in the physiopathology of different neurologic disorders. This year an epidemiologic study from Iran [51] compared the prevalence of *H. pylori* infection, diagnosed by urea breath test, in three groups of patients with either idiopathic generalized epilepsy ($n = 34$) or temporal lobe epilepsy ($n = 28$) and healthy controls ($n = 33$). They did not find any significant difference between the groups. Kountouras et al. [52] stressed that *H. pylori* prevalence was very high in this region, and the study required a larger study size.

Miscusi et al. [53] reported the case of an acute motor-sensory axonal neuropathy with a nephrotic syndrome possibly associated with an *H. pylori* infection. Immunoglobulin and antibiotic treatment led to a slight neurologic improvement and renal function restoration.

Multiple sclerosis (MS) and neuromyelitis optica (NMO) are both known to be central nervous system (CNS) inflammatory demyelinating diseases. Since 2004, the distinction between the 2 disorders is possible

due to the discovery of anti-aquaporin 4 circulating autoantibody, only present in NMO [54]. Several studies suggested that environmental factors, like *H. pylori* infection, could partially trigger these two disorders [55–58]. This year, Long et al. [59] found that *H. pylori* antibodies were significantly more present in NMO patients than in MS and controls groups (90.4% (47/52) vs 73.8% (31/42) and 59.3% (16/27), respectively, $p < .05$); these results were confirmed in a Japanese study [60]. A possible homology between human aquaporin 4 and some *H. pylori* water channel proteins or neutrophil-activating protein has been evoked as an explanatory mechanism [61].

Previous epidemiologic studies found an association between *H. pylori* infection and neurodegenerative diseases like Parkinson's disease [62,63] and Alzheimer's disease (AD) while others did not [64–66]. Using the nationwide Danish Registers, Nielsen et al. [67] investigated the impact of *H. pylori* infection on the development of Parkinson's disease. They found that the combined prescription of *H. pylori* eradication and proton-pump inhibitors, 5 or more years prior to the diagnosis of Parkinson's disease, was associated with an increased risk of developing Parkinson's disease. They did not find any association between gastritis or peptic ulcers and Parkinson's disease. Then, *H. pylori* infection may contribute to Parkinson's disease, or be the cause or a consequence of the first signs of Parkinson's disease.

AD, another neurodegenerative disease, has also been associated with *H. pylori* infection. Roubaud Baudron et al. published two studies this year. The first study [68] showed via a multivariate analysis that, in a group of 53 AD patients, *H. pylori* seroprevalence was significantly associated with a more important cognitive impairment. The number of AD patients included was limited but the inclusion criteria were strict (neuropsychologic test, cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers, and morphologic data). The second study [69] focused on the association of *H. pylori* infection with the risk of developing dementia in a longitudinal population-based cohort of elderly adults living in the community ($n = 603$). At baseline, dementia prevalence was higher in the infected group. After 20 years of follow-up, 148 incident cases of dementia were diagnosed. After controlling for known dementia risk factors, *H. pylori* infection was determined to be a risk factor for developing dementia (hazard ratio = 1.46, $p = .04$). They hypothesized that *H. pylori* infection, like other chronic inflammation models, could enhance neuroinflammation and cerebrovascular lesions worsening AD lesions.

Regarding these two neurodegenerative diseases, Kountouras et al. [70,71] proposed a mechanistic

hypothesis, involving the brain–blood barrier disruption with the release of proinflammatory and vasoactive substances and the induction of apoptosis.

Eye, Ear, Nose, and Throat Disorders

Zullo et al. [72] compiled the results of the six available studies [73–78] in an editorial and did not find any significant difference in the *H. pylori* prevalence between glaucoma patients and controls. They concluded that there was limited evidence supporting the role of *H. pylori* in glaucoma pathogenesis. This editorial was followed by numerous comments but with no new data confirming or invalidating this hypothesis [79,80]. A single open-labeled noncomparative study showed that *H. pylori* eradication may have favorable effects on the outcome of chronic central serous chorioretinopathy [81], but the authors considered this result in the context of a possible spontaneous regression of this pathology.

Another controversy concerned the implication of *H. pylori* infection as a risk factor in laryngeal cancer. Whereas Pajic-Penavic et al. [82] did not detect *H. pylori* DNA in healthy laryngeal mucosa, Izadi et al. [83] identified *H. pylori* DNA in 9% (5/55) patients with benign laryngeal lesions. Then Gong et al. [84] compared *H. pylori* DNA detection between 81 patients with laryngeal squamous cell carcinoma and 75 control subjects in a case–control study. After adjusting for confounding factors, regression analysis indicated that the presence of the bacteria was an independent risk factor for laryngeal cancer (OR = 7.15, 95% CI [3.29, 15.53], $p < .001$).

To test the relationship between *H. pylori* and laryngopharyngeal reflux, Cekin et al. [85] studied 43 patients with a laryngeal lesion; *H. pylori* DNA was detected in larynx samples from 24 patients (55.8%); however, they found no association between *H. pylori*, laryngopharyngeal reflux and malignant/premalignant laryngeal lesion status.

Several studies compared *H. pylori* strains isolated simultaneously in the oral cavity (including dental plaque or squamous cell cancer) and gastric mucosa (neoplasia, chronic gastritis) [86–89]. All of these studies suggested that the oral cavity could represent a reservoir of *H. pylori* with the risk of recolonization of the stomach after systemic eradication therapy.

H. pylori was also suggested as one of the etiologic agents of recurrent aphthous stomatitis. Tas et al. [90] studied the impact of *H. pylori* eradication on the clinical course of recurrent aphthous stomatitis with a follow-up of 6 months. In the successfully eradicated group ($n = 18$), vitamin B12 levels were significantly

increased, and the mean number of aphthous lesions was significantly decreased. A possible beneficial effect of *H. pylori* eradication in patients with recurrent aphthous stomatitis due to an increase in vitamin B12 levels after eradication was hypothesized. No association was found between *H. pylori* and oral lichen planus [91].

Pregnancy

Regarding gastritis and possible vitamin deficits induced by *H. pylori* infection, two studies tested the association between *H. pylori* infection and hyperemesis gravidarum characterized by intractable vomiting in pregnant women [92] and the occurrence of neural tube defects in newborns [93], but the low inclusion rate limited the conclusions to be drawn.

The cross-reactivity between anti-*H. pylori* antibodies and other antigens is one of the hypotheses to explain the role of *H. pylori* infection in extradigestive disease. Based on this mechanism, Franceschi et al. [94] attempted to explain the epidemiologic association between CagA-positive *H. pylori* strains and previously reported pre-eclampsia [95–98]. They used placenta samples from healthy women and tested the ability of anti-CagA antibodies to recognize trophoblast cells and invasive potential and pro-inflammatory properties of trophoblast cells in the presence or absence of anti-CagA antibodies. Results supported the hypothesis that anti-CagA antibodies recognize cytotrophoblast cells and reduce their invasiveness.

All-Cause Mortality

Chen et al. [99] in a prospective cohort analysis with 9895 participants (<41 year) followed for at least 12 years (the National Health and Nutrition examination Survey III) did not conclude that *H. pylori* infection was a major risk factor for all-cause mortality. In fact, in this cohort, *H. pylori* positivity (including CagA strains) was not associated with increased all-cause mortality. *H. pylori* infection was associated with an increased risk of death due to gastric cancer, but with reduced risks of death due to stroke and lung cancer.

Conclusions

Over the last year, several diseases have been reported to be associated with *H. pylori* infection and/or CagA-positive strains. Their role, in some hematologic condition, such as ITP, idiopathic sideropenic anemia, and vitamin B12 deficiency, has been fully validated and included in the current guidelines. There is a positive trend in favor of an association between *H. pylori*

infection and neurodegenerative disorders. Furthermore, there are new data concerning a reduced risk of death due to stroke and lung cancer in patients with *H. pylori* infection but an increased risk of pre-eclampsia in women infected by CagA-positive strains, which deserves further investigations.

Acknowledgements and Disclosures

Competing interests: the authors have no competing interests.

References

- Franceschi F, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007;21:325–34.
- Gasbarrini A, Franceschi F, Cammarota G, Pola P, Gasbarrini G. Vascular and immunological disorders associated with *Helicobacter pylori* infection. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998;30:115–8.
- Eskandarian R, Ghorbani R, Shiyasi M, Momeni B, Hajifathalian K, Madani M. Prognostic role of *Helicobacter pylori* infection in acute coronary syndrome: a prospective cohort study. *Cardiovasc J Afr* 2012;23:131–5.
- Schöttker B, Adamu MA, Weck MN, Müller H, Brenner H. *Helicobacter pylori* infection, chronic atrophic gastritis and major cardiovascular events: a population-based cohort study. *Atherosclerosis* 2012;220:569–74.
- Grub C, Brunborg C, Hasselvedt V, Aukrust P, Førre O, Almdahl SM, Hollan I. Antibodies to common infectious agents in coronary artery disease patients with and without rheumatic conditions. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:679–85.
- Pellicano R, Franceschi F, Saracco G, Fagoonee S, Roccarina D, Gasbarrini A. *Helicobacters* and extragastric diseases. *Helicobacter* 2009;14(Suppl 1):58–68.
- Chen BF, Xu X, Deng Y, Ma SC, Tang LQ, Zhang SB, Chen ZF. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and serum interleukin-18 in patients with carotid atherosclerosis. *Helicobacter* 2013;18:124–8.
- Longo-Mbenza B, Nsenga JN, Mokondjimobe E, Gombet T, Assori IN, Ibara JR, et al. *Helicobacter pylori* infection is identified as a cardiovascular risk factor in Central Africans. *Vasc Health Risk Manag* 2012;6:455–61.
- Izadi M, Fazel M, Sharubandi SH, Saadat SH, Farahani MM, Nasser MH, et al. *Helicobacter* species in the atherosclerotic plaques of patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Pathol* 2012;21:307–11.
- Zhou X, Zhang C, Wu J, Zhang G. Association between *Helicobacter pylori* infection and diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetes Res Clin Pract* 2013;99:200–8.
- Jeon CY, Haan MN, Cheng C, Clayton ER, Mayeda ER, Miller JW, Aiello AE. *Helicobacter pylori* infection is associated with an increased rate of diabetes. *Diabetes Care* 2012;35:520–5.
- Shin DW, Kwon HT, Kang JM, Park JH, Choi HC, Park MS, et al. Association between metabolic syndrome and *Helicobacter pylori* infection diagnosed by histologic status and serological status. *J Clin Gastroenterol* 2012;46:840–5.
- Chen Y, Blaser MJ. Association between gastric *Helicobacter pylori* colonization and glycated hemoglobin levels. *J Infect Dis* 2012;205:1195–202.
- Akanuma M, Yanai A, Sakamoto K, Hirata Y, Yamaji Y, Kawazu S, Maeda S. Influence of *Helicobacter pylori* eradication on the management of type 2 diabetes. *Hepatogastroenterology* 2012;59:641–5.
- Tseng CH. Diabetes, insulin use and *Helicobacter pylori* eradication: a retrospective cohort study. *BMC Gastroenterol* 2012;9:12–46.
- Candelli M, Rigante D, Schiavino A, Gabrielli M, Crea F, Minguell Del Lungo L, et al. High reinfection rate of *Helicobacter pylori* in young type 1 diabetic patients: a three-year follow-up study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012;16:1468–72.
- Chung GE, Heo NJ, Park MJ, Chung SJ, Kang HY, Kang SJ. *Helicobacter pylori* seropositivity in diabetic patients is associated with microalbuminuria. *World J Gastroenterol* 2013;19:97–102.
- Oluyemi A, Anomneze E, Smith S, Fasanmade O. Prevalence of a marker of active *Helicobacter pylori* infection among patients with type 2 diabetes mellitus in Lagos, Nigeria. *BMC Res Notes* 2012;5:284.
- Xia W, Zhang X, Wang J, Sun C, Wu L. Survey of anaemia and *Helicobacter pylori* infection in adolescent girls in Suihua, China and enhancement of iron intervention effects by *H. pylori* eradication. *Br J Nutr* 2012;108:357–62.
- Duque X, Vilchis J, Mera R, Trejo-Valdivia B, Goodman KJ, Mendoza ME, et al. Natural history of *Helicobacter pylori* infection in Mexican schoolchildren: incidence and spontaneous clearance. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;55:209–16.
- Wang Z, Zhang L, Guo Z, Liu L, Ji J, Zhang J, et al. A unique feature of iron loss via close adhesion of *Helicobacter pylori* to host erythrocytes. *PLoS ONE* 2012;7:e50314.
- Soundaravally R, Pukazhvandthen P, Zachariah B, Hamide A. Plasma ferritin and indices of oxidative stress in *Helicobacter pylori* infection among school children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013;56:519–22.
- Yokota S, Toita N, Yamamoto S, Fujii N, Konno M. Positive relationship between a polymorphism in *Helicobacter pylori* Neutrophil-activating protein A gene and iron-deficiency anemia. *Helicobacter* 2013;18:112–6.
- Hasni SA. Role of *Helicobacter pylori* infection in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:429–34.
- Payandeh M, Sohrabi N, Zare ME, Kansestani AN, Hashemian AH. Platelet count response to *Helicobacter pylori* eradication in Iranian patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012;4:e2012056.
- Franceschi F, Christodoulides N, Kroll MH, Genta RM. *Helicobacter pylori* and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 2004;140:766–7.
- Saito A, Yokohama A, Osaki Y, Ogawa Y, Nakahashi H, Toyama K, et al. *Helicobacter pylori*-associated immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2012;88:340–9.
- Doğan Z, Filik L, Ergül B, Sarikaya M, Akbal E. Association between *Helicobacter pylori* and liver-to-spleen ratio: a randomized-controlled single-blind study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013;25:107–10.
- Shi W, Liu W, Zhou X, Ye F, Zhang G. Associations of *Helicobacter pylori* infection and cytotoxin-associated gene A status with autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. *Thyroid* 2013 April 2. [Epub ahead of print]
- Ram M, Barzilai O, Shapira Y, Anaya JM, Tincani A, Stojanovich L, et al. *Helicobacter pylori* serology in autoimmune diseases – fact or fiction? *Clin Chem Lab Med* 2013;51(5):1075–82.
- Zhou X, Wu J, Zhang G. Association between *Helicobacter pylori* and asthma: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013;25:460–8.

- 32 Wang Q, Yu C, Sun Y. The association between asthma and *Helicobacter pylori*: a meta-analysis. *Helicobacter* 2013;18:41–53.
- 33 Wang Y, Bi Y, Zhang L, Wang C. Is *Helicobacter pylori* infection associated with asthma risk? A meta-analysis based on 770 cases and 785 controls. *Int J Med Sci* 2012;9:603–10.
- 34 Oertli M, Müller A. *Helicobacter pylori* targets dendritic cells to induce immune tolerance, promote persistence and confer protection against allergic asthma. *Gut Microbes* 2012;3:566–71.
- 35 Siva R, Birring SS, Berry M, Rowbottom A, Pavord ID. Peptic ulceration, *Helicobacter Pylori* seropositivity and chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 2013;18:728–31.
- 36 Magen E, Schlesinger M, Hadari I. Chronic urticaria can be triggered by eradication of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2013;18:83–7.
- 37 El-Khalawany M, Mahmoud A, Mosbeh AS, A B D Alsalam F, Ghonaim N, Abou-Bakr A. Role of *Helicobacter pylori* in common rosacea subtypes: a genotypic comparative study of Egyptian patients. *J Dermatol* 2012;39:989–95.
- 38 Zhou D, Wang JD, Weng MZ, Zhang Y, Wang XF, Gong W, Quan ZW. Infections of *Helicobacter* spp. in the biliary system are associated with biliary tract cancer: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013;25:447–54.
- 39 Mishra RR, Tewari M, Shukla HS. Association of *Helicobacter pylori* infection with inflammatory cytokine expression in patients with gallbladder cancer. *Indian J Gastroenterol* 2013;32:232–5.
- 40 Alexander S, Lemmens VE, Houterman S, Nollen L, Roumen R, Slooter GD. Gallbladder cancer, a vanishing disease? *Cancer Causes Control* 2012;23:1705–9.
- 41 Boonyanugomol W, Chomvarin C, Sripan B, Bhudhisawasdi V, Khuntikeo N, Hahnvajjanawong C, Chamsuwan A. *Helicobacter pylori* in Thai patients with cholangiocarcinoma and its association with biliary inflammation and proliferation. *HPB (Oxford)* 2012;14:177–84.
- 42 Boonyanugomol W, Chomvarin C, Sripan B, Chau-In S, Pugkhem A, Namwat W, et al. Molecular analysis of *Helicobacter pylori* virulent-associated genes in hepatobiliary patients. *HPB (Oxford)* 2012;14:754–63.
- 43 Boonyanugomol W, Chomvarin C, Song JY, Kim KM, Kim JM, Cho MJ, et al. Effects of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl-transpeptidase on apoptosis and inflammation in human biliary cells. *Dig Dis Sci* 2012;57:2615–24.
- 44 Shapira Y, Agmon-Levin N, Renaudineau Y, Porat-Katz BS, Barzilai O, Ram M, et al. Serum markers of infections in patients with primary biliary cirrhosis: evidence of infection burden. *Exp Mol Pathol* 2012;93:386–90.
- 45 Esmat G, El-Bendary M, Zakarya S, Ela MA, Zalata K. Role of *Helicobacter pylori* in patients with HCV-related chronic hepatitis and cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma: possible association with disease progression. *J Viral Hepat* 2012;19:473–9.
- 46 Okoli AS, Raftery MJ, Mendz GL. Comparison of *Helicobacter bilis*-associated protein expression in Huh7 cells harbouring HCV replicon and in replicon-cured cells. *Int J Hepatol* 2012;2012:501671.
- 47 Kruttgen A, Horz HP, Weber-Heynemann J, Vucur M, Trautwein C, Haase G, et al. Study on the association of *Helicobacter* species with viral hepatitis-induced hepatocellular carcinoma. *Gut Microbes* 2012;3:228–33.
- 48 Le Roux-Goglin E, Dubus P, Asencio C, Jutand MA, Rosenbaum J, Megraud F. Hepatic lesions observed in hepatitis C virus transgenic mice infected by *Helicobacter hepaticus*. *Helicobacter* 2013;18:33–40.
- 49 Qin SY, Jiang HX, Ning HJ, Nie HM, Tao L, Hu BL, Guo XY. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on blood ammonia levels in cirrhotic patients: a systematic review. *Hepatogastroenterology* 2012;59:2576–81.
- 50 Polyzos SA, Kountouras J, Papatheodorou A, Patsiaoura K, Katsiki E, Zafeiriadou E, et al. *Helicobacter pylori* infection in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2013;62:121–6.
- 51 Asadi-Pooya AA, Dehghani SM, Petramfar P, Emami M, Mahmoodi M. *Helicobacter pylori* infection in patients with epilepsy. *Seizure* 2012;21:21–3.
- 52 Kountouras J, Deretzi G, Zavos C, Gavalas E, Polyzos SA, Klonizakis P, et al. *Helicobacter pylori*'s potential association with epilepsy. *Seizure* 2012;21:151.
- 53 Miscusi M, Curra A, Della Rocca C, Missori P, Petrozza V. Acute motor-sensory axonal neuropathy after cervical spine surgery. *J Neurosurg Spine* 2012;17:82–5.
- 54 Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004;364:2106–12.
- 55 Kountouras J, Zavos C, Gavalas E, Deretzi G, Katsinelos P, Boura P, et al. *Helicobacter pylori* may be a common denominator associated with systemic and multiple sclerosis. *Joint Bone Spine* 2011;78:222–3.
- 56 Li W, Minohara M, Piao H, Matsushita T, Masaki K, Matsuoka T, et al. Association of anti-*Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein antibody response with anti-aquaporin-4 autoimmunity in Japanese patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Mult Scler* 2009;15:1411–21.
- 57 Li W, Minohara M, Su JJ, Matsuoka T, Osoegawa M, Ishizu T, Kira J. *Helicobacter pylori* infection is a potential protective factor against conventional multiple sclerosis in the Japanese population. *J Neuroimmunol* 2007;184:227–31.
- 58 Prasad H, Krishnaprasad MS, Karnaker VK. Therapeutic induction of *Helicobacter pylori* bacteraemia in multiple sclerosis: how far from reality? *Med Hypotheses* 2008;71:610–1.
- 59 Long Y, Gao C, Qiu W, Hu X, Shu Y, Peng F, Lu Z. *Helicobacter pylori* infection in Neuromyelitis Optica and Multiple Sclerosis. *NeuroImmunoModulation* 2012;20:107–12.
- 60 Yoshimura S, Isobe N, Matsushita T, Yonekawa T, Masaki K, Sato S, et al. Distinct genetic and infectious profiles in Japanese neuromyelitis optica patients according to anti-aquaporin 4 antibody status. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:29–34.
- 61 Kountouras J, Zavos C, Deretzi G, Gavalas E, Chatzopoulos D, Katsinelos P, et al. Potential implications of *Helicobacter pylori*-related neutrophil-activating protein. *World J Gastroenterol* 2012;18:489–90.
- 62 Weller C, Charlett A, Oxlade NL, Dobbs SM, Dobbs RJ, Peterson DW, Bjarnason IT. Role of chronic infection and inflammation in the gastrointestinal tract in the etiology and pathogenesis of idiopathic parkinsonism. Part 3: predicted probability and gradients of severity of idiopathic parkinsonism based on *H. pylori* antibody profile. *Helicobacter* 2005;10:288–97.
- 63 Charlett A, Dobbs RJ, Dobbs SM, Weller C, Brady P, Peterson DW. Parkinsonism: siblings share *Helicobacter pylori* seropositivity and facets of syndrome. *Acta Neurol Scand* 1999;99:26–35.
- 64 Kountouras J, Tsolaki M, Gavalas E, Boziki M, Zavos C, Karatzoglou P, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer disease. *Neurology* 2006;66:938–40.
- 65 Malaguamera M, Bella R, Alagona G, Ferri R, Carnemolla A, Pennisi G. *Helicobacter pylori* and Alzheimer's disease: a possible link. *Eur J Intern Med* 2004;15:381–6.

- 66 Shiota S, Murakami K, Yoshiiwa A, Yamamoto K, Ohno S, Kuroda A, et al. The relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer's disease in Japan. *J Neurol* 2011;258:1460–3.
- 67 Nielsen HH, Qiu J, Friis S, Wermuth L, Ritz B. Treatment for *Helicobacter pylori* infection and risk of Parkinson's disease in Denmark. *Eur J Neurol* 2012;19:864–9.
- 68 Roubaud-Baudron C, Krolak-Salmon P, Quadrio I, Megraud F, Salles N. Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease: preliminary results. *Neurobiol Aging* 2012;33:1009, e1011–09.
- 69 Roubaud Baudron C, Letenneur L, Langlais A, Buissonniere A, Megraud F, et al. Does *Helicobacter pylori* infection increase incidence of dementia? The Personnes Agees QUID Study. *J Am Geriatr Soc* 2013;61:74–8.
- 70 Kountouras J, Boziki M, Zavos C, Gavalas E, Giartza-Taxidou E, Venizelos I, et al. A potential impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease pathobiology and course. *Neurobiol Aging* 2012;33:e3–4.
- 71 Kountouras J, Zavos C, Polyzos SA, Deretzi G, Vardaka E, Giartza-Taxidou E, et al. *Helicobacter pylori* infection and Parkinson's disease: apoptosis as an underlying common contributor. *Eur J Neurol* 2012;19:e56.
- 72 Zullo A, Ridola L, Hassan C, Bruzzese V, Papini F, Vaira D. Glaucoma and *Helicobacter pylori*: eyes wide shut? *Dig Liver Dis* 2012;44:627–8.
- 73 Deshpande N, Lalitha P, Krishna das SR, Jethani J, Pillai RM, Robin A, Karthik R. *Helicobacter pylori* IgG antibodies in aqueous humor and serum of subjects with primary open angle and pseudo-exfoliation glaucoma in a South Indian population. *J Glaucoma* 2008;17:605–10.
- 74 Galloway PH, Warner SJ, Morshed MG, Mikelberg FS. *Helicobacter pylori* infection and the risk for open-angle glaucoma. *Ophthalmology* 2003;110:922–5.
- 75 Kim JM, Kim SH, Park KH, Han SY, Shim HS. Investigation of the association between *Helicobacter pylori* infection and normal tension glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:665–8.
- 76 Kountouras J, Mylopoulos N, Chatzopoulos D, Zavos C, Boura P, Konstas AG, Venizelos J. Eradication of *Helicobacter pylori* may be beneficial in the management of chronic open-angle glaucoma. *Arch Intern Med* 2002;162:1237–44.
- 77 Kurtz S, Regenbogen M, Goldiner I, Horowitz N, Moshkowitz M. No association between *Helicobacter pylori* infection or CagA-bearing strains and glaucoma. *J Glaucoma* 2008;17:223–6.
- 78 Zavos C, Kountouras J, Sakkias G, Venizelos I, Deretzi G, Arapoglou S. Histological presence of *Helicobacter pylori* bacteria in the trabeculum and iris of patients with primary open-angle glaucoma. *Ophthalmic Res* 2012;47:150–6.
- 79 Bagnis A, Izzotti A, Sacca SC. *Helicobacter pylori*, oxidative stress and glaucoma. *Dig Liver Dis* 2012;44:963–4; author reply 964–5.
- 80 Kountouras J, Zavos C, Katsinelos P, Vardaka E. Glaucoma and *Helicobacter pylori*: eyes “wide open”? *Dig Liver Dis* 2012;44:962–3; author reply 963.
- 81 Casella AM, Berbel RF, Bressanim GL, Malaguido MR, Cardillo JA. *Helicobacter pylori* as a potential target for the treatment of central serous chorioretinopathy. *Clinics (Sao Paulo)* 2012;67:1047–52.
- 82 Pajic-Penavic I, Danic D, Maslovara S, Gall-Troselj K. Absence of *Helicobacter pylori* in healthy laryngeal mucosa. *J Laryngol Otol* 2012;126:196–9.
- 83 Izadi F, Ahmadi A, Ghourchian S, Daneshi A, Memari F, Khadivi E, Mohammadi S. Detection of *Helicobacter pylori* in benign laryngeal lesions by polymerase chain reaction: a cross sectional study. *Infect Agent Cancer* 2012;7:10.
- 84 Gong H, Shi Y, Zhou L, Tao L, Shi Y, Cao W, Cheng L. *Helicobacter pylori* infection of the larynx may be an emerging risk factor for laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Transl Oncol* 2012;14:905–10.
- 85 Cekin E, Ozyurt M, Erkul E, Ergunay K, Cincik H, Kapucu B, Gungor A. The association between *Helicobacter pylori* and laryngopharyngeal reflux in laryngeal pathologies. *Ear Nose Throat J* 2012;91:E6–9.
- 86 Lukes P, Pavlik E, Potuznikova B, Plzak J, Nartova E, Dosedel J, et al. Comparison of *Helicobacter pylori* genotypes obtained from the oropharynx and stomach of the same individuals – a pilot study. *Prague Med Rep* 2012;113:231–9.
- 87 Sepulveda E, Moreno J, Spencer ML, Quilodran S, Brethauer U, Briceno C, Garcia A. Comparison of *Helicobacter pylori* in oral cavity and gastric mucosa according to virulence genotype (cagA and vacA m 1). *Rev Chilena Infectol* 2012;29:278–83.
- 88 Roman-Roman A, Giono-Cerezo S, Camorlinga-Ponce M, Martinez-Carrillo DN, Loaiza-Loeza S, Fernandez-Tilapa G. *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and stomach of patients with chronic gastritis and gastric ulcer. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013;31:130–5.
- 89 Agarwal S, Jithendra KD. Presence of *Helicobacter pylori* in subgingival plaque of periodontitis patients with and without dyspepsia, detected by polymerase chain reaction and culture. *J Indian Soc Periodontol* 2012;16:398–403.
- 90 Tas DA, Yakar T, Sakalli H, Serin E. Impact of *Helicobacter pylori* on the clinical course of recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2013;42:89–94.
- 91 Pourshahidi S, Fakhri F, Ebrahimi H, Fakhraei B, Alipour A, Ghapanchi J, Farjadian S. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection and oral lichen planus. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:1745–7.
- 92 Shaban MM, Kandil HO, Elshafei AH. *Helicobacter pylori* Seropositivity in Patients With Hyperemesis Gravidarum. *Am J Med Sci* 2013 Mar 1. [Epub ahead of print]
- 93 Golalipour MJ, Sedehi M, Qorbani M. Does maternal *Helicobacter pylori* infection increase the risk of occurrence of neural tube defects in newborns in Northern Iran? *Neurosciences (Riyadh)* 2012;17:219–25.
- 94 Franceschi F, Di Simone N, D'Ippolito S, Castellani R, Di Nicuolo F, Gasbarrini G, et al. Antibodies anti-CagA cross-react with trophoblast cells: a risk factor for pre-eclampsia? *Helicobacter* 2012;17:426–34.
- 95 Panarelli M, Sattar N. Pre-eclampsia associated with *Helicobacter pylori* seropositivity. *J Hypertens* 2006;24:2353–4.
- 96 Ponzetto A, Cardaropoli S, Piccoli E, Rolfo A, Gennero L, Kanduc D, Todros T. Pre-eclampsia is associated with *Helicobacter pylori* seropositivity in Italy. *J Hypertens* 2006;24:2445–9.
- 97 UstUn Y, Engin-UstUn Y, Ozkaplan E, Otlu B, Sait TekerekoGlu M. Association of *Helicobacter pylori* infection with systemic inflammation in preeclampsia. *J Matern Fetal Neonat* 2010;23:311–4.
- 98 Pugliese A, Beltramo T, Todros T, Cardaropoli S, Ponzetto A. Interleukin-18 and gestosis: correlation with *Helicobacter pylori* seropositivity. *Cell Biochem Funct* 2008;26:817–9.
- 99 Chen Y, Segers S, Blaser MJ. Association between *Helicobacter pylori* and mortality in the NHANES III study. *Gut* 2013 Jan 16. [Epub ahead of print]

Annexe 2. Mini Mental status Examination

Mini Mental State Examination (MMSE) (Version consensuelle du GRECO)

Orientation

/ 10

Je vais vous poser quelques questions pour apprécier comment fonctionne votre mémoire.

Les unes sont très simples, les autres un peu moins. Vous devez répondre du mieux que vous pouvez.

Quelle est la date complète d'aujourd'hui ? _____

Si la réponse est incorrecte ou incomplète, posez les questions restées sans réponse, dans l'ordre suivant :

1. En quelle année sommes-nous ?
2. En quelle saison ?
3. En quel mois ?
4. Quel jour du mois ?
5. Quel jour de la semaine ?

☐
☐
☐
☐
☐

Je vais vous poser maintenant quelques questions sur l'endroit où nous trouvons.

6. Quel est le nom de l'hôpital où nous sommes ?*
7. Dans quelle ville se trouve-t-il ?
8. Quel est le nom du département dans lequel est située cette ville ?**
9. Dans quelle province ou région est située ce département ?
10. A quel étage sommes-nous ?

☐
☐
☐
☐
☐

Apprentissage

/ 3

Je vais vous dire trois mots ; je vous voudrais que vous me les répétiez et que vous essayiez de les retenir car je vous les redemanderai tout à l'heure.

- | | | | | |
|------------|----|--------|----|----------|
| 11. Cigare | | Citron | | Fauteuil |
| 12. Fleur | ou | Clé | ou | Tulipe |
| 13. Porte | | Ballon | | Canard |

☐
☐
☐

Répéter les 3 mots.

Attention et calcul

/ 5

Voulez-vous compter à partir de 100 en retirant 7 à chaque fois ?*

- | | | |
|-----|----|--------------------------|
| 14. | 93 | <input type="checkbox"/> |
| 15. | 86 | <input type="checkbox"/> |
| 16. | 79 | <input type="checkbox"/> |
| 17. | 72 | <input type="checkbox"/> |
| 18. | 65 | <input type="checkbox"/> |

Pour tous les sujets, même pour ceux qui ont obtenu le maximum de points, demander :

Voulez-vous épeler le mot MONDE à l'envers ?**

Rappel

/ 3

Pouvez-vous me dire quels étaient les 3 mots que je vous ai demandés de répéter et de retenir tout à l'heure ?

- | | | | | |
|------------|----|--------|----|----------|
| 11. Cigare | | Citron | | Fauteuil |
| 12. Fleur | ou | Clé | ou | Tulipe |
| 13. Porte | | Ballon | | Canard |

☐
☐
☐

Langage

/ 8

Montrer un crayon.

22. Quel est le nom de cet objet ?*

Montrer votre montre.

23. Quel est le nom de cet objet ?**

24. Ecoutez bien et répétez après moi : « PAS DE MAIS, DE SI, NI DE ET »***

☐
☐
☐

Poser une feuille de papier sur le bureau, la montrer au sujet en lui disant : « Ecoutez bien et faites ce que je vais vous dire :

25. Prenez cette feuille de papier avec votre main droite,

26. Pliez-la en deux,

27. Et jetez-la par terre. »****

☐
☐
☐

Tendre au sujet une feuille de papier sur laquelle est écrit en gros caractère : « FERMEZ LES YEUX » et dire au sujet :

28. « Faites ce qui est écrit ».

☐

Tendre au sujet une feuille de papier et un stylo, en disant :

29. « Voulez-vous m'écrire une phrase, ce que vous voulez, mais une phrase entière. »*****

☐

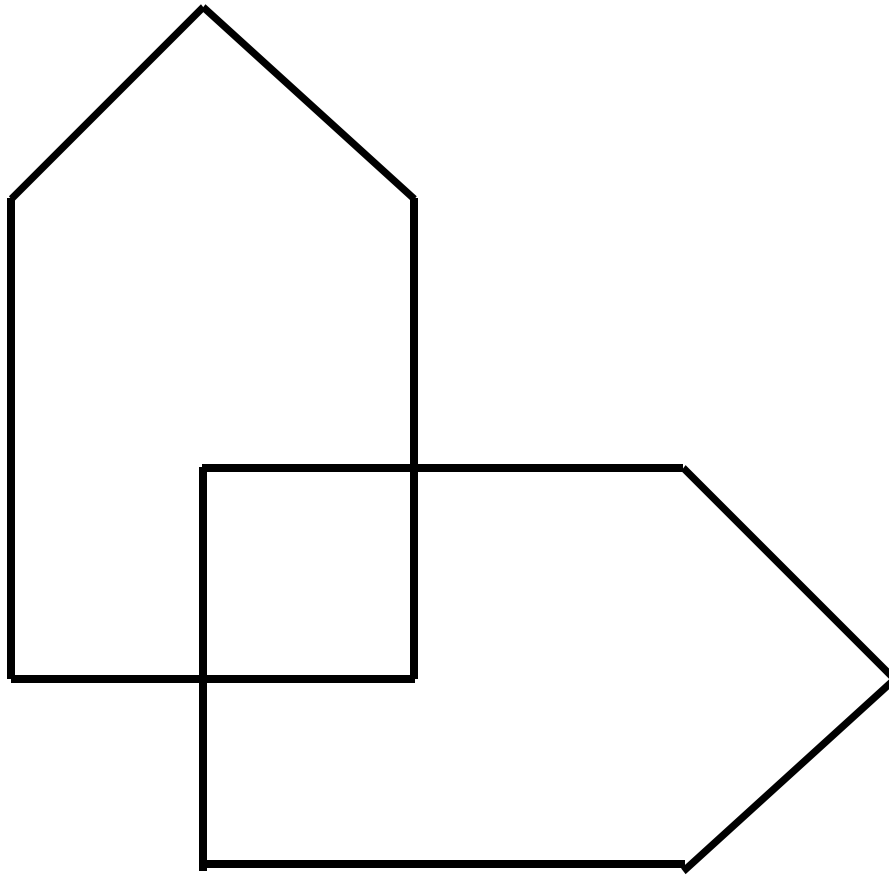
Praxies constructives

/ 1

Tendre au sujet une feuille de papier et lui demander : 30. « Voulez-vous recopier ce dessin ? »

☐

« FERMEZ LES YEUX »



VIII. REFERENCES

1. Consensus development conference on *Helicobacter pylori*. Revised conclusions and recommendations of the Working group 1999. *Gastroenterol Clin Biol* 23:C95-104.
2. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. 2003 *Br J Haematol*. 120:574-596.
3. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 1994 61:1-241.
4. Aisen, P. S., S. Gauthier, B. Vellas, R. Briand, D. Saumier, J. Laurin, and D. Garceau. 2007. Alzhemed: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 4:473-478.
5. Allen, L. A., L. S. Schlesinger, and B. Kang. 2000. Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *J exp Med* 191:115-128.
6. Alperovitch, A., A. Boland, M. Delepoine, B. Dubois, E. Duron, J. Epelbaum, C *et al.* 2013. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 45:1452-1458.
7. Alsop, D. C., W. Dai, M. Grossman, and J. A. Detre. 2010. Arterial spin labeling blood flow MRI: its role in the early characterization of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 20:871-880.
8. Alvarez, G., J. Aldudo, M. Alonso, S. Santana, and F. Valdivieso. 2012. Herpes simplex virus type 1 induces nuclear accumulation of hyperphosphorylated tau in neuronal cells. *J Neurosci Res* 90:1020-1029.
9. Alvarez, X. A., A. Franco, L. Fernandez-Novoa, and R. Cacabelos. 1996. Blood levels of histamine, IL-1 beta, and TNF-alpha in patients with mild to moderate Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol* 29:237-252.
10. Alzheimer, A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung des Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatr. Psychisch. Gerichtl. Med.* 64:146-148.
11. Alzheimer, A., R. A. Stelzmann, H. N. Schnitzlein, and F. R. Murtagh. 1995. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin Anat* 8:429-431.
12. Ameriso, S. F., E. A. Fridman, R. C. Leiguarda, and G. E. Sevlever. 2001. Detection of *Helicobacter pylori* in human carotid atherosclerotic plaques. *Stroke* 32:385-391.
13. Amieva, M. R., and E. M. El-Omar. 2008. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 134:306-323.
14. Amouyel, P., O. Vidal, J. M. Launay, and J. L. Laplanche. 1994. The apolipoprotein E alleles as major susceptibility factors for Creutzfeldt-Jakob disease. The French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies. *Lancet* 344:1315-1318.
15. Annibale, B., G. Capurso, E. Lahner, S. Passi, R. Ricci, F. Maggio, and G. Delle Fave. 2003. Concomitant alterations in intragastric pH and ascorbic acid concentration in patients with *Helicobacter pylori* gastritis and associated iron deficiency anaemia. *Gut* 52:496-501.

16. Annibale, B., M. Marignani, B. Monarca, G. Antonelli, A. Marcheggiano, G. Martino, F. Mandelli, R. Caprilli, and G. Delle Fave. 1999. Reversal of iron deficiency anemia after *Helicobacter pylori* eradication in patients with asymptomatic gastritis. *Ann Intern Med* 131:668-672.
17. Anstey, K. J., H. A. Mack, and N. Cherbuin. 2009. Alcohol consumption as a risk factor for dementia and cognitive decline: meta-analysis of prospective studies. *Am J Geriatr Psychiatry* 17:542-555.
18. Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte, and B. T. Hyman. 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631-639.
19. Asadi-Pooya, A. A., S. M. Dehghani, P. Petramfar, M. Emami, and M. Mahmoodi. 2012. *Helicobacter pylori* infection in patients with epilepsy. *Seizure* 21:21-23.
20. Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, Jr., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 270:17771-17777.
21. Bachy, V., and P. Aucouturier. 2010. [Prion diseases: what is the role of dendritic cells in the pathogenesis of transmissible prion diseases?]. *Med Sci (Paris)* 26:615-620.
22. Backert, S., and M. Selbach. 2008. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol* 10:1573-1581.
23. Balin, B. J., H. C. Gerard, E. J. Arking, D. M. Appelt, P. J. Branigan, J. T. Abrams, J. A. Whittum-Hudson, and A. P. Hudson. 1998. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol* 187:23-42.
24. Ballard, C., S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland, and E. Jones. 2011. Alzheimer's disease. *Lancet* 377:1019-1031.
25. Bamford, K. B., X. Fan, S. E. Crowe, J. F. Leary, W. K. Gourley, G. K. Luthra, E. G. Brooks, D. Y. Graham, V. E. Reyes, and P. B. Ernst. 1998. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 114:482-492.
26. Banatvala, N., K. Mayo, F. Megraud, R. Jennings, J. J. Deeks, and R. A. Feldman. 1993. The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis* 168:219-221.
27. Baringer, J. R., and P. Pisani. 1994. Herpes simplex virus genomes in human nervous system tissue analyzed by polymerase chain reaction. *Ann Neurol* 36:823-829.
28. Barrientos, R. M., E. A. Higgins, J. C. Biedenkapp, D. B. Sprunger, K. J. Wright-Hardesty, L. R. Watkins, J. W. Rudy, and S. F. Maier. 2006. Peripheral infection and aging interact to impair hippocampal memory consolidation. *Neurobiol Aging* 27:723-732.
29. Bayerdorffer, E., A. Neubauer, B. Rudolph, C. Thiede, N. Lehn, S. Eidt, and M. Stolte. 1995. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet* 345:1591-1594.
30. Beffert, U., P. Bertrand, D. Champagne, S. Gauthier, and J. Poirier. 1998. HSV-1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 351:1330-1331.
31. Benarroch, E. E. 2007. Neurovascular unit dysfunction: a vascular component of Alzheimer disease? *Neurology* 68:1730-1732.
- Bermejo, P., S. Martin-Aragon, J. Benedi, C. Susin, E. Felici, P. Gil, J. M. Ribera, and A. M. Villar. 2008. Differences of peripheral inflammatory markers between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Immunol Lett* 117:198-202.

33. Bertrand, E., M. Fromont-Racine, R. Pictet, and T. Grange. 1993. Visualization of the interaction of a regulatory protein with RNA in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3496-3500.
34. Beydoun, M. A., H. A. Beydoun, M. R. Shroff, M. H. Kitner-Triolo, and A. B. Zonderman. 2013. *Helicobacter pylori* seropositivity and cognitive performance among US adults: evidence from a large national survey. *Psychosom Med* 75:486-496.
35. Beydoun, M. A., H. A. Beydoun, and Y. Wang. 2008. Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 9:204-218.
36. Blasi, F., M. L. Ranzi, M. Erba, P. Tarsia, R. Raccanelli, L. Fagetti, and L. Allegra. 1996. No evidence for the presence of *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques in abdominal aortic aneurysm specimens. *Atherosclerosis* 126:339-340.
37. Boche, D., and J. A. Nicoll. 2008. The role of the immune system in clearance of Abeta from the brain. *Brain Pathol* 18:267-278.
38. Boelen, E., F. R. Stassen, A. J. van der Ven, M. A. Lemmens, H. P. Steinbusch, C. A. Bruggeman, C. Schmitz, and H. W. Steinbusch. 2007. Detection of amyloid beta aggregates in the brain of BALB/c mice after *Chlamydia pneumoniae* infection. *Acta Neuropathol* 114:255-261.
39. Boelen, E., H. W. Steinbusch, A. J. van der Ven, G. Grauls, C. A. Bruggeman, and F. R. Stassen. 2007. *Chlamydia pneumoniae* infection of brain cells: an in vitro study. *Neurobiol Aging* 28:524-532.
40. Bolmont, T., F. Clavaguera, M. Meyer-Luehmann, M. C. Herzig, R. Radde, M. Staufenbiel, J. Lewis, M. Hutton, M. Tolnay, and M. Jucker. 2007. Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *Am J Pathol* 171:2012-2020.
41. Bonardi, C., F. de Pulford, D. Jennings, and M. C. Pardon. 2011. A detailed analysis of the early context extinction deficits seen in APPswe/PS1dE9 female mice and their relevance to preclinical Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 222:89-97.
42. Bouras, C., E. Kovari, F. R. Herrmann, C. B. Rivara, T. L. Bailey, A. von Gunten, P. R. Hof, and P. Giannakopoulos. 2006. Stereologic analysis of microvascular morphology in the elderly: Alzheimer disease pathology and cognitive status. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:235-244.
43. Burucoa, C., J. C. Delchier, A. Courillon-Mallet, J. D. de Korwin, F. Megraud, F. Zerbib, J. Raymond, and J. L. Fauchere. 2013. Comparative evaluation of 29 commercial *Helicobacter pylori* serological kits. *Helicobacter* 18:169-179.
44. Calvet, X., M. J. Ramirez Lazaro, P. Lehours, and F. Megraud. 2013. Diagnosis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 18 Suppl 1:5-11.
45. Cambau, E., V. Allerheiligen, C. Coulon, C. Corbel, C. Lascols, L. Deforges, C. J. Soussy, J. C. Delchier, and F. Megraud. 2009. Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 47:3600-3607.
46. Chang, Y. P., G. F. Chiu, F. C. Kuo, C. L. Lai, Y. H. Yang, H. M. Hu, P. Y. Chang, C. Y. Chen, D. C. Wu, and F. J. Yu. 2013. Eradication of *Helicobacter pylori* Is Associated with the Progression of Dementia: A Population-Based Study. *Gastroenterol Res Pract* 2013:175-729.
47. Chaturvedi, R., Y. Cheng, M. Asim, F. I. Bussiere, H. Xu, A. P. Gobert, A. Hacker, R. A. Casero, Jr., and K. T. Wilson. 2004. Induction of polyamine oxidase 1 by *Helicobacter*

- pylori* causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and mitochondrial membrane depolarization. J Biol Chem 279:40161-40173.
48. Chen, B. F., X. Xu, Y. Deng, S. C. Ma, L. Q. Tang, S. B. Zhang, and Z. F. Chen. 2013. Relationship Between *Helicobacter pylori* Infection and Serum Interleukin-18 in Patients with Carotid Atherosclerosis. *Helicobacter* 18:124-128.
 49. Chen, Y., S. Segers, and M. J. Blaser. 2013. Association between *Helicobacter pylori* and mortality in the NHANES III study. *Gut* 62(9):1262-1269
 50. Chui, H. C., C. Zarow, W. J. Mack, W. G. Ellis, L. Zheng, W. J. Jagust, D. Mungas, B. R. Reed, J. H. Kramer, C. C. Decarli, M. W. Weiner, and H. V. Vinters. 2006. Cognitive impact of subcortical vascular and Alzheimer's disease pathology. *Ann Neurol* 60:677-687.
 51. Clifford, D. B., and B. M. Ances. 2013. HIV-associated neurocognitive disorder. *Lancet Infect Dis* 13:976-986.
 52. Clyne, M., A. Labigne, and B. Drumm. 1995. *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive in the presence of urea. *Infect Immun* 63:1669-1673.
 53. Correa, P., W. Haenszel, C. Cuello, S. Tannenbaum, and M. Archer. 1975. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 2:58-60.
 54. Crabtree, J. E., T. M. Shallcross, R. V. Heatley, and J. I. Wyatt. 1991. Mucosal tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut* 32:1473-1477.
 55. Cramer, P. E., J. R. Cirrito, D. W. Wesson, C. Y. Lee, J. C. Karlo, A. E. Zinn, B. T. Casali, J. L. Restivo, W. D. Goebel, M. J. James, K. R. Brunden, D. A. Wilson, and G. E. Landreth. 2012. ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* 335:1503-1506.
 56. Cremonini, F., M. Gabrielli, G. Gasbarrini, P. Pola, and A. Gasbarrini. 2004. The relationship between chronic *H. pylori* infection, CagA seropositivity and stroke: meta-analysis. *Atherosclerosis* 173:253-259.
 57. Crystal, H., D. Dickson, P. Fuld, D. Masur, R. Scott, M. Mehler, J. Masdeu, C. Kawas, M. Aronson, and L. Wolfson. 1988. Clinico-pathologic studies in dementia: nondemented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurology* 38:1682-1687.
 58. Cummings, J. L., and C. Back. 1998. The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 6:S64-78.
 59. Cuoco, L., G. Cammarota, R. A. Jorizzo, L. Santarelli, R. Cianci, M. Montalto, A. Gasbarrini, and G. Gasbarrini. 2001. Link between *Helicobacter pylori* infection and iron-deficiency anaemia in patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 36:1284-1288.
 60. Danesh, J., and R. Peto. 1998. Risk factors for coronary heart disease and infection with *Helicobacter pylori*: meta-analysis of 18 studies. *BMJ* 316:1130-1132.
 61. Davies, P., and A. J. Maloney. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2:1403.
 62. Davis, D. G., F. A. Schmitt, D. R. Wekstein, and W. R. Markesbery. 1999. Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:376-388.
 63. De Bastiani, R., M. Gabrielli, E. Ubaldi, E. Benedetto, G. Sanna, C. Cottone, M. Candelli, M. A. Zocco, N. Saulnier, A. Santoliquido, P. Papaleo, G. Gasbarrini, and A. Gasbarrini.

2008. High prevalence of Cag-A positive *H. pylori* strains in ischemic stroke: a primary care multicenter study. *Helicobacter* 13:274-277.
64. De Chiara, G., M. E. Marcocci, L. Civitelli, R. Argnani, R. Piacentini, C. Ripoli, R. Manservigi, C. Grassi, E. Garaci, and A. T. Palamara. 2010. APP processing induced by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) yields several APP fragments in human and rat neuronal cells PLoS One 5:e13989.
 65. de Groot, J. C., F. E. de Leeuw, M. Oudkerk, J. van Gijn, A. Hofman, J. Jolles, and M. M. Breteler. 2000. Cerebral white matter lesions and cognitive function: the Rotterdam Scan Study. *Ann Neurol* 47:145-151.
 66. de la Torre, J. C. 2004. Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *Lancet Neurol* 3:184-190.
 67. Dixon, M. F., R. M. Genta, J. H. Yardley, and P. Correa. 1996. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 20:1161-1181.
 68. Dobbs, R. J., S. M. Dobbs, C. Weller, I. T. Bjarnason, N. L. Oxlade, A. Charlett, M. A. Al-Janabi, R. W. Kerwin, R. F. Mahler, and A. B. Price. 2005. Role of chronic infection and inflammation in the gastrointestinal tract in the etiology and pathogenesis of idiopathic parkinsonism. Part 1: eradication of *Helicobacter* in the cachexia of idiopathic parkinsonism. *Helicobacter* 10:267-275.
 69. Donahue, J. E., S. L. Flaherty, C. E. Johanson, J. A. Duncan, 3rd, G. D. Silverberg, M. C. Miller, R. Tavares, W. Yang, Q. Wu, E. Sabo, V. Hovanesian, and E. G. Stopa. 2006. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 112:405-415.
 70. Doody, R. S., R. G. Thomas, M. Farlow, T. Iwatsubo, B. Vellas, S. Joffe, K. Kieburtz, R. Raman, X. Sun, P. S. Aisen, E. Siemers, H. Liu-Seifert, and R. Mohs. 2014. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *New Engl J Med* 370:311-321.
 71. Dubois, B., H. H. Feldman, C. Jacova, S. T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, J. Cummings, A. Delacourte, D. Galasko, S. Gauthier, G. Jicha, K. Meguro, J. O'Brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, Y. Stern, P. J. Visser, and P. Scheltens. 2007. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6:734-746.
 72. Duyckaerts, C., M. C. Potier, and B. Delatour. 2008. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115:5-38.
 73. Edison, P., H. A. Archer, A. Gerhard, R. Hinz, N. Pavese, F. E. Turkheimer, A. Hammers, Y. F. Tai, N. Fox, A. Kennedy, M. Rossor, and D. J. Brooks. 2008. Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. *Neurobiol Dis* 32:412-419.
 74. Eisele, Y. S., U. Obermuller, G. Heilbronner, F. Baumann, S. A. Kaeser, H. Wolburg, L. C. Walker, M. Staufenbiel, M. Heikenwalder, and M. Jucker. 2010. Peripherally applied Abeta-containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis. *Science* 330:980-982.
 75. Elkind, M. S., J. M. Luna, Y. P. Moon, B. Boden-Albala, K. M. Liu, S. Spitalnik, T. Rundek, R. L. Sacco, and M. C. Paik. 2010. Infectious burden and carotid plaque thickness: the northern Manhattan study. *Stroke* 41:e117-122.
 76. Elkind, M. S., P. Ramakrishnan, Y. P. Moon, B. Boden-Albala, K. M. Liu, S. L. Spitalnik, T. Rundek, R. L. Sacco, and M. C. Paik. 2010. Infectious burden and risk of stroke: the northern Manhattan study. *Arch Neurol* 67:33-38.

77. Elkind, M. S., M. L. Tondella, D. R. Feikin, B. S. Fields, S. Homma, and M. R. Di Tullio. 2006. Seropositivity to *Chlamydia pneumoniae* is associated with risk of first ischemic stroke. *Stroke* 37:790-795.
78. Emilia, G., G. Longo, M. Luppi, G. Gandini, M. Morselli, L. Ferrara, S. Amarri, K. Cagossi, and G. Torelli. 2001. *Helicobacter pylori* eradication can induce platelet recovery in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 97:812-814.
79. Emilia, G., M. Luppi, P. Zucchini, M. Morselli, L. Potenza, F. Forghieri, F. Volzone, G. Jovic, G. Leonardi, A. Donelli, and G. Torelli. 2007. *Helicobacter pylori* infection and chronic immune thrombocytopenic purpura: long-term results of bacterium eradication and association with bacterium virulence profiles. *Blood* 110:3833-3841.
80. Epstein, S. E. 2002. The multiple mechanisms by which infection may contribute to atherosclerosis development and course. *Circ Res* 90:2-4.
81. Etminan, M., S. Gill, and A. Samii. 2003. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 327:128.
82. Fallon, B. A., and J. A. Nields. 1994. Lyme disease: a neuropsychiatric illness. *Am J Psychiatry* 151:1571-1583.
83. Farrer, L. A., L. A. Cupples, J. L. Haines, B. Hyman, W. A. Kukull, R. Mayeux, R. H. Myers, M. A. Pericak-Vance, N. Risch, and C. M. van Duijn. 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278:1349-1356.
84. Farsak, B., A. Yildirim, Y. Akyon, A. Pinar, M. Oc, E. Boke, S. Kes, and L. Tokgozoglu. 2000. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* DNA in human atherosclerotic plaques by PCR. *J Clin Microbiol* 38:4408-4411.
85. Ferri, C. P., M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P. R. Menezes, E. Rimmer, and M. Scazufca. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-2117.
86. Fischer, O. 1907. Miliare Nekrosen mit drüsigen Wucherungen der Nervenfasern, eine regelmässige Veränderung der Hirnrinde bei seniler Demenz. *Monatsschr F Psychiat Neurol* 22:361-372.
87. Fitz, N. F., A. A. Cronican, I. Lefterov, and R. Koldamova. 2013. Comment on "ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models". *Science* 340:924-c.
88. Folsom, A. R., F. J. Nieto, P. Sorlie, L. E. Chambless, and D. Y. Graham. 1998. *Helicobacter pylori* seropositivity and coronary heart disease incidence. Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study Investigators. *Circulation* 98:845-850.
89. Folstein, M. F., S. E. Folstein, and P. R. McHugh. 1975. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12:189-198.
90. Forloni, G., L. Colombo, L. Girola, F. Tagliavini, and M. Salmona. 2001. Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro. *FEBS letters* 487:404-407.
91. Franceschi, F., N. Christodoulides, M. H. Kroll, and R. M. Genta. 2004. *Helicobacter pylori* and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 140:766-767.
92. Franceschi, F., and A. Gasbarrini. 2007. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 21:325-334.

93. Franceschi, F., G. Niccoli, G. Ferrante, A. Gasbarrini, A. Baldi, M. Candelli, F. Feroce, N. Saulnier, M. Conte, D. Roccarina, G. A. Lanza, G. Gasbarrini, S. N. Gentiloni, and F. Crea. 2009. CagA antigen of *Helicobacter pylori* and coronary instability: insight from a clinico-pathological study and a meta-analysis of 4241 cases. *Atherosclerosis* 202:535-542.
94. Franceschi, F., G. Zuccala, D. Roccarina, and A. Gasbarrini. 2014. Clinical effects of *Helicobacter pylori* outside the stomach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11:234-242.
95. Franchini, M., M. Cruciani, C. Mengoli, G. Pizzolo, and D. Veneri. 2007. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on platelet count in idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 60:237-246.
96. Galbussera, A., L. Tremolizzo, V. Isella, G. Gelosa, R. Vezzo, L. Vigore, M. Brenna, C. Ferrarese, and I. Appollonio. 2008. Lack of evidence for *Borrelia burgdorferi* seropositivity in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 22:308.
97. Galimberti, D., N. Schoonenboom, P. Scheltens, C. Fenoglio, E. Venturelli, Y. A. Pijnenburg, N. Bresolin, and E. Scarpini. 2006. Intrathecal chemokine levels in Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 66:146-147.
98. Galmiche, A., J. Rassow, A. Doye, S. Cagnol, J. C. Chambard, S. Contamin, V. de Thillot, I. Just, V. Ricci, E. Solcia, E. Van Obberghen, and P. Boquet. 2000. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *Embo J* 19:6361-6370.
99. Gasbarrini, A., F. Franceschi, R. Tartaglione, R. Landolfi, P. Pola, and G. Gasbarrini. 1998. Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 352:878.
100. Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas. 2003. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 301:1099-1102.
101. Genin, E., D. Hannequin, D. Wallon, K. Sleegers, M. Hiltunen, O. Combarros, M. J. *et al.* 2011. APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry* 16:903-907.
102. Gerard, H. C., U. Dreses-Werringloer, K. S. Wildt, S. Deka, C. Oszust, B. J. Balin, W. H. Frey, 2nd, E. Z. Bordayo, J. A. Whittum-Hudson, and A. P. Hudson. 2006. *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48:355-366.
103. Gerard, H. C., K. L. Wildt, J. A. Whittum-Hudson, Z. Lai, J. Ager, and A. P. Hudson. 2005. The load of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain varies with APOE genotype. *Microb Pathog* 39:19-26.
104. Gewirtz, A. T., Y. Yu, U. S. Krishna, D. A. Israel, S. L. Lyons, and R. M. Peek, Jr. 2004. *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis* 189:1914-1920.
105. Giannakopoulos, P., F. R. Herrmann, T. Bussiere, C. Bouras, E. Kovari, D. P. Perl, J. H. Morrison, G. Gold, and P. R. Hof. 2003. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 60:1495-1500.
106. Gieffers, J., E. Reusche, W. Solbach, and M. Maass. 2000. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in brain sections of Alzheimer's disease patients. *J Clin Microbiol* 38:881-882.
107. Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, and *et al.* 1991. Segregation of a missense mutation in

- the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
108. Godeau, B., and M. Michel. 2014. Treatment of chronic immune thrombocytopenic purpura in adults. *Ann hematol*.
 109. Gong, H., Y. Shi, L. Zhou, L. Tao, Y. Shi, W. Cao, and L. Cheng. 2012. *Helicobacter pylori* infection of the larynx may be an emerging risk factor for laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Transl Oncol* 14:905-910.
 110. Gordon, L., S. McQuaid, and S. L. Cosby. 1996. Detection of herpes simplex virus (types 1 and 2) and human herpesvirus 6 DNA in human brain tissue by polymerase chain reaction. *Clin Diagn Virol* 6:33-40.
 111. Gosselet, F., P. Candela, R. Cecchelli, and L. Fenart. 2011. [Role of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease]. *Med Sci* 27:987-992.
 112. Green, R. C., L. S. Schneider, D. A. Amato, A. P. Beelen, G. Wilcock, E. A. Swabb, and K. H. Zavitz. 2009. Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 302:2557-2564.
 113. Griffin, W. S., and S. W. Barger. 2010. Neuroinflammatory Cytokines-The Common Thread in Alzheimer's Pathogenesis. *US Neurol* 6:19-27.
 114. Griffin, W. S., L. C. Stanley, C. Ling, L. White, V. MacLeod, L. J. Perrot, C. L. White, 3rd, and C. Araoz. 1989. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7611-7615.
 115. Grimaz, S., D. Damiani, P. Brosolo, C. Skert, A. Geromin, and G. de Pretis. 1999. Resolution of thrombocytopenia after treatment for *Helicobacter pylori*: a case report. *Haematologica* 84:283-284.
 116. Group, N. 2001. Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (MRC CFAS). *Lancet* 357:169-175.
 117. Gutacker, M., C. Valsangiacomo, T. Balmelli, M. V. Bernasconi, C. Bouras, and J. C. Piffaretti. 1998. Arguments against the involvement of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Alzheimer's disease. *Res Microbiol* 149:31-37.
 118. Guzman-Sanchez, F., F. Valdivieso, and J. S. Burgos. 2012. Aging-related neurostructural, neuropathological, and behavioral changes associated with herpes simplex virus type 1 brain infection in mice. *J Alzheimer Dis* 30:779-790.
 119. Haider, A. W., P. W. Wilson, M. G. Larson, J. C. Evans, E. L. Michelson, P. A. Wolf, C. J. O'Donnell, and D. Levy. 2002. The association of seropositivity to *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, and cytomegalovirus with risk of cardiovascular disease: a prospective study. *J Am Coll Cardiol* 40:1408-1413.
 120. Hamer, M., and Y. Chida. 2009. Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. *Psycholog Med* 39:3-11.
 121. Hammond, C. J., L. R. Hallock, R. J. Howanski, D. M. Appelt, C. S. Little, and B. J. Balin. 2010. Immunohistological detection of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's disease brain. *BMC Neurosci* 11:121.
 122. Hanger, D. P., D. H. Lau, E. C. Phillips, M. K. Bondulich, T. Guo, B. W. Woodward, A. M. Pooler, and W. Noble. 2014. Intracellular and extracellular roles for tau in neurodegenerative disease. *J Alzheimers Dis* 40:S37-45.

123. Hardy, J. 1992. An 'anatomical cascade hypothesis' for Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 15:200-201.
124. Hardy, J. A., and G. A. Higgins. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.
125. Hauss-Wegrzyniak, B., P. D. Vraniak, and G. L. Wenk. 2000. LPS-induced neuroinflammatory effects do not recover with time. *Neuroreport* 11:1759-1763.
126. Hemar, A., and C. Mulle. 2011. [Alzheimer's disease, amyloid peptide and synaptic dysfunction]. *Med Sci* 27:733-736.
127. Heuschmann, P. U., D. Neureiter, M. Gesslein, B. Craiovan, M. Maass, G. Faller, G. Beck, B. Neundoerfer, and P. L. Kolominsky-Rabas. 2001. Association between infection with *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* and risk of ischemic stroke subtypes: Results from a population-based case-control study. *Stroke* 32:2253-2258.
128. Hofman, A., A. Ott, M. M. Breteler, M. L. Bots, A. J. Slieter, F. van Harskamp, C. N. van Duijn, C. Van Broeckhoven, and D. E. Grobbee. 1997. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 349:151-154.
129. Holmes, C. 2013. Review: systemic inflammation and Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39:51-68.
130. Holmes, C., D. Boche, D. Wilkinson, G. Yadegarfar, V. Hopkins, A. Bayer, R. W. Jones, R. Bullock, S. Love, J. W. Neal, E. Zotova, and J. A. Nicoll. 2008. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* 372:216-223.
131. Holmes, C., C. Cunningham, E. Zotova, J. Woolford, C. Dean, S. Kerr, D. Culliford, and V. H. Perry. 2009. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* 73:768-774.
132. Huang, W. S., T. Y. Yang, W. C. Shen, C. L. Lin, M. C. Lin, and C. H. Kao. 2014. Association between *Helicobacter pylori* infection and dementia. *J Clin Neurosci*.
133. Huang, X., X. Qu, W. Yan, Y. Huang, M. Cai, B. Hu, L. Wu, H. Lin, Z. Chen, C. Zhu, L. Lu, X. Sun, L. Rong, Y. Jiang, D. Sun, L. Zhong, and P. Xiong. 2010. Iron deficiency anaemia can be improved after eradication of *Helicobacter pylori*. *Postgrad Med J* 86:272-278.
134. Ill-Raga, G., E. Palomer, M. A. Wozniak, E. Ramos-Fernandez, M. Bosch-Morato, M. Tajés, F. X. Guix, J. J. Galan, J. Clarimon, C. Antunez, L. M. Real, M. Boada, R. F. Itzhaki, C. Fandos, and F. J. Munoz. 2011. Activation of PKR causes amyloid ss-peptide accumulation via de-repression of BACE1 expression. *PLoS One* 6:e21456.
135. Itabashi, S., H. Arai, T. Matsui, S. Higuchi, and H. Sasaki. 1997. Herpes simplex virus and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 349:1102.
136. Itzhaki, R. F., W. R. Lin, D. Shang, G. K. Wilcock, B. Faragher, and G. A. Jamieson. 1997. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 349:241-244.
137. Jamieson, G. A., N. J. Maitland, G. K. Wilcock, J. Craske, and R. F. Itzhaki. 1991. Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *J Med Virol* 33:224-227.
138. Jamieson, G. A., N. J. Maitland, G. K. Wilcock, C. M. Yates, and R. F. Itzhaki. 1992. Herpes simplex virus type 1 DNA is present in specific regions of brain from aged people with and without senile dementia of the Alzheimer type. *J Pathol* 167:365-368.

139. Jankowsky, J. L., D. J. Fadale, J. Anderson, G. M. Xu, V. Gonzales, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, M. K. Lee, L. H. Younkin, S. L. Wagner, S. G. Younkin, and D. R. Borchelt. 2004. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* 13:159-170.
140. Jarque, I., R. Andreu, I. Llopis, J. De la Rubia, F. Gomis, L. Senent, C. Jimenez, G. Martin, J. A. Martinez, G. F. Sanz, J. Ponce, and M. A. Sanz. 2001. Absence of platelet response after eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br j Haematol* 115:1002-1003.
141. Jaturapatporn, D., M. G. Isaac, J. McCleery, and N. Tabet. 2012. Aspirin, steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *The Cochrane database Syst Rev* 2:CD006378
142. Jenkinson, L., K. D. Bardhan, J. Atherton, and N. Kalia. 2002. *Helicobacter pylori* prevents proliferative stage of angiogenesis in vitro: role of cytokines. *Dig Dis Sci* 47:1857-1862.
143. Kahan, T., P. Lundman, G. Olsson, and M. Wendt. 2000. Greater than normal prevalence of seropositivity for *Helicobacter pylori* among patients who have suffered myocardial infarction. *Coron Artery Dis* 11:523-526.
144. Kaklikkaya, I., N. Kaklikkaya, K. Buruk, Z. Pulathan, I. Koramaz, F. Aydin, I. Tosun, A. Osman Kilic, and F. Ozcan. 2006. Investigation of *Chlamydia pneumoniae* DNA, chlamydial lipopolisaccharide antigens, and *Helicobacter pylori* DNA in atherosclerotic plaques of patients with aortoiliac occlusive disease. *Cardiovasc Pathol* 15:105-109.
145. Kalia, N., C. Jones, D. K. Bardhan, M. W. Reed, J. C. Atherton, and N. J. Brown. 2001. Effects of genotypically different strains of *Helicobacter pylori* on human microvascular endothelial cells in vitro. *Dig Dis Sci* 46:54-61.
146. Kanbay, M., G. Gur, M. Yucel, U. Yilmaz, and S. Boyacioglu. 2005. Does eradication of *Helicobacter pylori* infection help normalize serum lipid and CRP levels? *Dig Dis Sci* 50:1228-1231.
147. Kaplan, M., S. S. Yavuz, B. Cinar, V. Koksall, M. S. Kut, F. Yapici, H. Gercekoglu, and M. M. Demirtas. 2006. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques of carotid artery by polymerase chain reaction. *Int J Infect Dis* 10:116-123.
148. Kaptan, K., C. Beyan, A. U. Ural, T. Cetin, F. Avcu, M. Gulsen, R. Finci, and A. Yalcin. 2000. *Helicobacter pylori*--is it a novel causative agent in Vitamin B12 deficiency? *Arch Intern Med* 160:1349-1353.
149. Katan, M., Y. P. Moon, M. C. Paik, R. L. Sacco, C. B. Wright, and M. S. Elkind. 2013. Infectious burden and cognitive function: the Northern Manhattan Study. *Neurology* 80:1209-1215.
150. Kidd, M., and I. M. Modlin. 1998. A century of *Helicobacter pylori*: paradigms lost-paradigms regained. *Digestion* 59:1-15.
151. Kitazawa, M., S. Oddo, T. R. Yamasaki, K. N. Green, and F. M. LaFerla. 2005. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:8843-8853.
152. Kivipelto, M., E. L. Helkala, M. P. Laakso, T. Hanninen, M. Hallikainen, K. Alhainen, H. Soininen, J. Tuomilehto, and A. Nissinen. 2001. Midlife vascular risk factors and

- Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322:1447-1451.
153. Klein, P. D., D. Y. Graham, A. Gaillour, A. R. Opekun, and E. O. Smith. 1991. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. *Lancet* 337:1503-1506.
 154. Konturek, S. J., P. C. Konturek, J. W. Konturek, M. Plonka, M. Czesnikiewicz-Guzik, T. Brzozowski, and W. Bielanski. 2006. *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 3:29-50.
 155. Kountouras, J., M. Boziki, E. Gavalas, C. Zavos, G. Deretzi, S. Chatzigeorgiou, P. Katsinelos, N. Grigoriadis, E. Giartza-Taxidou, and I. Venizelos. 2010. Five-year survival after *Helicobacter pylori* eradication in Alzheimer disease patients. *Cogn Behav Neurol* 23:199-204.
 156. Kountouras, J., M. Boziki, E. Gavalas, C. Zavos, N. Grigoriadis, G. Deretzi, D. Tzilves, P. Katsinelos, M. Tsolaki, D. Chatzopoulos, and I. Venizelos. 2009. Eradication of *Helicobacter pylori* may be beneficial in the management of Alzheimer's disease. *J Neurol* 256:758-767.
 157. Kountouras, J., M. Tsolaki, E. Gavalas, M. Boziki, C. Zavos, P. Karatzoglou, D. Chatzopoulos, and I. Venizelos. 2006. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer disease. *Neurology* 66:938-940.
 158. Kountouras, J., C. Zavos, G. Deretzi, E. Gavalas, D. Chatzopoulos, P. Katsinelos, E. Tsiaousi, S. Gagalis, S. A. Polyzos, and I. Venizelos. 2012. Potential implications of *Helicobacter pylori*-related neutrophil-activating protein. *World J Gastroenterol* 18:489-490.
 159. Kowalski, M. 2001. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection in coronary artery disease: influence of *H. pylori* eradication on coronary artery lumen after percutaneous transluminal coronary angioplasty. The detection of *H. pylori* specific DNA in human coronary atherosclerotic plaque. *J Physiol Pharmacol* 52:3-31.
 160. Kowalski, M., P. C. Konturek, P. Pieniazek, E. Karczewska, A. Kluczka, R. Grove, W. Kranig, R. Nasser, J. Thale, E. G. Hahn, and S. J. Konturek. 2001. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in coronary artery disease and effect of its eradication on coronary lumen reduction after percutaneous coronary angioplasty. *Dig Liver Dis* 33:222-229.
 161. Kuck, D., B. Kolmerer, C. Iking-Konert, P. H. Krammer, W. Stremmel, and J. Rudi. 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun* 69:5080-5087.
 162. Kuipers, E. J. 1999. Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 13 Suppl 1:3-11.
 163. Lannfelt, L., K. Blennow, H. Zetterberg, S. Batsman, D. Ames, J. Harrison, C. L. Masters, S. Targum, A. I. Bush, R. Murdoch, J. Wilson, and C. W. Ritchie. 2008. Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting Abeta as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 7:779-786.
 164. Lansbury, P. T., and H. A. Lashuel. 2006. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature* 443:774-779.
 165. Leclerc, H. 2006. [Epidemiological aspects of *Helicobacter pylori* infection]. *Bull Acad Natl Med* 190:949-962.

166. Lee, A. 1998. The *Helicobacter pylori* genome--new insights into pathogenesis and therapeutics. *New Engl J Med* 338:832-833..
167. Lee, A., J. O'Rourke, M. C. De Ungria, B. Robertson, G. Daskalopoulos, and M. F. Dixon. 1997. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterol* 112:1386-1397.
168. Lee, C. Y., and G. E. Landreth. 2010. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm* 117:949-960.
169. Lee, Y., J. H. Back, J. Kim, S. H. Kim, D. L. Na, H. K. Cheong, C. H. Hong, and Y. G. Kim. 2010. Systematic review of health behavioral risks and cognitive health in older adults. *Internat Psychogeriatr* 22:174-187.
170. Lerchundi, R., R. Neira, S. Valdivia, K. Vio, M. I. Concha, A. Zambrano, and C. Otth. 2011. Tau cleavage at D421 by caspase-3 is induced in neurons and astrocytes infected with herpes simplex virus type 1. *J Alzheimers Dis* 23:513-520.
171. Leroy, K., K. Ando, C. Heraud, Z. Yilmaz, M. Authelet, J. M. Boeynaems, L. Buee, R. De Decker, and J. P. Brion. 2010. Lithium treatment arrests the development of neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice with advanced neurofibrillary pathology. *J Alzheimers Dis* 19:705-719.
172. Letenneur, L., K. Peres, H. Fleury, I. Garrigue, P. Barberger-Gateau, C. Helmer, J. M. Orgogozo, S. Gauthier, and J. F. Dartigues. 2008. Seropositivity to herpes simplex virus antibodies and risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study. *PLoS One* 3:e3637.
173. Levy-Lahad, E., W. Wasco, P. Poorkaj, D. M. Romano, J. Oshima, W. H. Pettingell, C. E. Yu, P. D. Jondro, S. D. Schmidt, K. Wang, and et al. 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973-977.
174. Lindholm, C., M. Quiding-Jarbrink, H. Lonroth, A. Hamlet, and A. M. Svennerholm. 1998. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect Immun* 66:5964-5971.
175. Little, C. S., C. J. Hammond, A. MacIntyre, B. J. Balin, and D. M. Appelt. 2004. *Chlamydia pneumoniae* induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice. *Neurobiol Aging* 25:419-429.
176. Liu, H., A. Ruskon-Fourmestiaux, A. Lavergne-Slove, H. Ye, T. Molina, Y. Bouhnik, R. A. Hamoudi, T. C. Diss, A. Dogan, F. Megraud, J. C. Rambaud, M. Q. Du, and P. G. Isaacson. 2001. Resistance of t(11;18) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Lancet* 357:39-40.
177. Liu, L., Y. Liu, W. Tong, H. Ye, X. Zhang, W. Cao, and Y. Zhang. 2007. Pathogen burden in essential hypertension. *Circ J* 71:1761-1764.
178. Loeb, M. B., D. W. Molloy, M. Smieja, T. Standish, C. H. Goldsmith, J. Mahony, S. Smith, M. Borrie, E. Decoteau, W. Davidson, A. McDougall, J. Gnarp, O. M. O'D, and M. Chernesky. 2004. A randomized, controlled trial of doxycycline and rifampin for patients with Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 52:381-387.
179. Long, Y., C. Gao, W. Qiu, X. Hu, Y. Shu, F. Peng, and Z. Lu. 2012. *Helicobacter pylori* infection in Neuromyelitis Optica and Multiple Sclerosis. *Neuroimmunomodulation* 20:107-112.
180. Lu, C. Y., C. H. Kuo, Y. C. Lo, H. Y. Chuang, Y. C. Yang, I. C. Wu, F. J. Yu, Y. C. Lee, C. M. Jan, W. M. Wang, and D. C. Wu. 2005. The best method of detecting prior *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 11:5672-5676.

181. Lu, F. P., K. P. Lin, and H. K. Kuo. 2009. Diabetes and the risk of multi-system aging phenotypes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 4:e4144.
182. Lu, Y. H., H. W. Yen, T. H. Lin, C. H. Huang, K. T. Lee, W. M. Wang, D. C. Wu, W. C. Voon, W. T. Lai, and S. H. Sheu. 2002. Changes of coronary risk factors after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Kaohsiung J Med Sci* 18:266-272.
183. Lue, L. F., L. Brachova, W. H. Civin, and J. Rogers. 1996. Inflammation, A beta deposition, and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:1083-1088.
184. MacDonald, A. B. 1986. Borrelia in the brains of patients dying with dementia. *JAMA* 256:2195-2196.
185. Mahley, R. W., K. H. Weisgraber, and Y. Huang. 2009. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res* 50 Suppl:S183-188.
186. Malaguarnera, M., R. Bella, G. Alagona, R. Ferri, A. Carnemolla, and G. Pennisi. 2004. *Helicobacter pylori* and Alzheimer's disease: a possible link. *Eur J Intern Med* 15:381-386.
187. Malaty, H. M., N. D. Logan, D. Y. Graham, and J. E. Ramchatesingh. 2001. *Helicobacter pylori* infection in preschool and school-aged minority children: effect of socioeconomic indicators and breast-feeding practices. *Clin Infect Dis* 32:1387-1392.
188. Malfertheiner, P., F. Bazzoli, J. C. Delchier, K. Celinski, M. Giguere, M. Riviere, and F. Megraud. 2011. *Helicobacter pylori* eradication with a capsule containing bismuth subcitrate potassium, metronidazole, and tetracycline given with omeprazole versus clarithromycin-based triple therapy: a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet* 377:905-913.
189. Malfertheiner, P., F. Megraud, C. O'Morain, F. Atherton, J. Axon, A. T. Bazzoli *et al.* 2012. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut* 61:646-664.
190. Malfertheiner, P., M. Selgrad, and J. Bornschein. 2012. *Helicobacter pylori*: clinical management. *Curr Opin Gastroenterol* 28:608-614.
191. Malik, A. A., A. K. Ganti, A. Potti, R. Levitt, and J. F. Hanley. 2002. Role of *Helicobacter pylori* infection in the incidence and clinical course of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Am j Gastroenterol* 97:1371-1374.
192. Malnick, S. D., S. Goland, A. Kaftoury, H. Schwarz, S. Pasik, A. Mashiach, and Z. Sthoeger. 1999. Evaluation of carotid arterial plaques after endarterectomy for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Cardiol* 83:1586-1587, A1588.
193. Mancuso, R., F. Baglio, M. Cabinio, E. Calabrese, A. Hernis, R. Nemni, and M. Clerici. 2014. Titers of herpes simplex virus type 1 antibodies positively correlate with grey matter volumes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 38:741-745.
194. Manolakis, A., A. N. Kapsoritakis, and S. P. Potamianos. 2007. A review of the postulated mechanisms concerning the association of *Helicobacter pylori* with ischemic heart disease. *Helicobacter* 12:287-297.
195. Marignani, M., S. Angeletti, C. Bordi, F. Malagnino, C. Mancino, G. Delle Fave, and B. Annibale. 1997. Reversal of long-standing iron deficiency anaemia after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 32:617-622.
196. Marino, M. C., C. A. de Oliveira, A. M. Rocha, G. A. Rocha, N. C. Clementino, L. F. Antunes, R. A. Oliveira, A. S. Martins, H. L. Del Puerto, V. D'Almeida, L. Galdieri, E. R. Pedroso, M. M. Cabral, A. M. Nogueira, and D. M. Queiroz. 2007. Long-term effect of

- Helicobacter pylori* eradication on plasma homocysteine in elderly patients with cobalamin deficiency. Gut 56:469-474.
197. Marques, A. R., S. C. Weir, G. A. Fahle, and S. H. Fischer. 2000. Lack of evidence of Borrelia involvement in Alzheimer's disease. J infect Dis 182:1006-1007.
 198. Marshall, B. J., and J. R. Warren. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1:1311-1315.
 199. Martin, C., B. Aguila, P. Araya, K. Vio, S. Valdivia, A. Zambrano, M. I. Concha, and C. Otth. 2014. Inflammatory and Neurodegeneration Markers during Asymptomatic HSV-1 Reactivation. J Alzheimers Dis 39:849-859.
 200. Mawer, E. B., J. Backhouse, M. Davies, L. F. Hill, and C. M. Taylor. 1976. Metabolic fate of administered 1,25-dihydroxycholecalciferol in controls and in patients with hypoparathyroidism. Lancet 1:1203-1206.
 201. Mawuenyega, K. G., W. Sigurdson, V. Ovod, L. Munsell, T. Kasten, J. C. Morris, K. E. Yarasheski, and R. J. Bateman. 2010. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. Science 330:1774.
 202. McGeer, P. L., and E. G. McGeer. 2007. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. Neurobiol Aging 28:639-647.
 203. McGuinness, B., S. Todd, A. P. Passmore, and R. Bullock. 2008. Systematic review: Blood pressure lowering in patients without prior cerebrovascular disease for prevention of cognitive impairment and dementia. J Neurol Neurosurg Psychiatry 79:4-5.
 204. McKhann, G., D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price, and E. M. Stadlan. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. Neurology 34:939-944.
 205. McLaughlin, R., N. M. Kin, M. F. Chen, N. P. Nair, and E. C. Chan. 1999. Alzheimer's disease may not be a spirochetosis. Neuroreport 10:1489-1491.
 206. Megraud, F., F. Bonnet, M. Garnier, and H. Lamouliatte. 1985. Characterization of "*Campylobacter pyloridis*" by culture, enzymatic profile, and protein content. J Clin Microbiol 22:1007-1010.
 207. Megraud, F., S. Coenen, A. Versporten, M. Kist, M. Lopez-Brea, A. M. Hirschl, L. P. Andersen, H. Goossens, and Y. Glupczynski. 2013. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. Gut 62:34-42.
 208. Megraud, F., and H. Lamouliatte. 1992. *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer. Evidence suggesting causation. Dig Dis Sci 37:769-772.
 209. Mendall, M. A., P. M. Goggin, N. Molineaux, J. Levy, T. Toosy, D. Strachan, A. J. Camm, and T. C. Northfield. 1994. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. Br Heart J 71:437-439.
 210. Michel, M., M. Khellaf, L. Desforges, K. Lee, A. Schaeffer, B. Godeau, and P. Bierling. 2002. Autoimmune thrombocytopenic Purpura and *Helicobacter pylori* infection. Arch Intern Med 162:1033-1036.
 211. Migneco, A., V. Ojetti, L. Specchia, F. Franceschi, M. Candelli, M. Mettimano, R. Montebelli, L. Savi, and G. Gasbarrini. 2003. Eradication of *Helicobacter pylori* infection improves blood pressure values in patients affected by hypertension. Helicobacter 8:585-589.
 212. Miklossy, J. 2011. Alzheimer's disease - a neurospirochetosis. Analysis of the evidence following Koch's and Hill's criteria. J Neuroinflammation 8:90.

213. Miklossy, J. 1993. Alzheimer's disease--a spirochetosis? *Neuroreport* 4:1069.
214. Miklossy, J. 2008. Chronic inflammation and amyloidogenesis in Alzheimer's disease -- role of Spirochetes. *J Alzheimers Dis* 13:381-391.
215. Miklossy, J., A. Kis, A. Radenovic, L. Miller, L. Forro, R. Martins, K. Reiss, N. Darbinian, P. Darekar, L. Mihaly, and K. Khalili. 2006. Beta-amyloid deposition and Alzheimer's type changes induced by *Borrelia spirochetes*. *Neurobiol Aging* 27:228-236.
216. Mori, I., Y. Kimura, H. Naiki, R. Matsubara, T. Takeuchi, T. Yokochi, and Y. Nishiyama. 2004. Reactivation of HSV-1 in the brain of patients with familial Alzheimer's disease. *J Med Virol* 73:605-611.
217. Naito, Y., and T. Yoshikawa. 2002. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 33:323-336.
218. N Nelson, P. T., I. Alafuzoff, E. H. Bigio, C. Bouras, H. Braak, N. J. Cairns, R. J *et al.* 2012. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* 71:362-381.
219. Nielsen, H. H., J. Qiu, S. Friis, L. Wermuth, and B. Ritz. 2012. Treatment for *Helicobacter pylori* infection and risk of Parkinson's disease in Denmark. *Eur J Neurol* 19:864-869.
220. Niemela, S., T. Karttunen, T. Korhonen, E. Laara, R. Karttunen, M. Ikaheimo, and Y. A. Kesaniemi. 1996. Could *Helicobacter pylori* infection increase the risk of coronary heart disease by modifying serum lipid concentrations? *Heart* 75:573-575.
221. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
222. Noach, L. A., N. B. Bosma, J. Jansen, F. J. Hoek, S. J. van Deventer, and G. N. Tytgat. 1994. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 29:425-429.
223. Nochlin, D., C. M. Shaw, L. A. Campbell, and C. C. Kuo. 1999. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in brain tissues of Alzheimer's disease. *Neurology* 53:1888.
224. Noguchi, H., and J. W. Moore. 1913. A Demonstration of *Treponema Pallidum* in the Brain in Cases of General Paralysis. *J Exp Med* 17:232-238.
225. Oshima, T., R. Ozono, Y. Yano, Y. Oishi, H. Teragawa, Y. Higashi, M. Yoshizumi, and M. Kambe. 2005. Association of *Helicobacter pylori* infection with systemic inflammation and endothelial dysfunction in healthy male subjects. *J Am Coll Cardiol* 45:1219-1222.
226. Ottemann, K. M., and A. C. Lowenthal. 2002. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun* 70:1984-1990.
227. Pappolla, M. A., R. Omar, B. Saran, A. Andorn, M. Suarez, C. Pavia, A. Weinstein, D. Shank, K. Davis, and W. Burgdorfer. 1989. Concurrent neuroborreliosis and Alzheimer's disease: analysis of the evidence. *Hum pathol* 20:753-757.
228. Paradowski, B., M. Jaremko, T. Dobosz, J. Leszek, and L. Noga. 2007. Evaluation of CSF-*Chlamydia pneumoniae*, CSF-tau, and CSF-Abeta42 in Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol* 254:154-159.
229. Parsonnet, J., G. D. Friedman, N. Orentreich, and H. Vogelstein. 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 40:297-301.

230. Pasceri, V., G. Cammarota, G. Patti, L. Cuoco, A. Gasbarrini, R. L. Grillo, G. Fedeli, G. Gasbarrini, and A. Maseri. 1998. Association of virulent *Helicobacter pylori* strains with ischemic heart disease. *Circulation* 97:1675-1679.
231. Pasceri, V., G. Patti, G. Cammarota, C. Pristipino, G. Richichi, and G. Di Sciascio. 2006. Virulent strains of *Helicobacter pylori* and vascular diseases: a meta-analysis. *Am Heart J* 151:1215-1222.
232. Patel, P., M. A. Mendall, D. Carrington, D. P. Strachan, E. Leatham, N. Molineaux, J. Levy, C. Blakeston, C. A. Seymour, A. J. Camm, and *et al.* 1995. Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *BMJ* 311:711-714.
233. Peach, H. G., N. E. Bath, and S. J. Farish. 1998. *Helicobacter pylori* infection: an added stressor on iron status of women in the community. *Med J Aust* 169:188-190.
234. Pearce, H. R., N. Kalia, K. D. Bardhan, J. C. Atherton, and N. J. Brown. 2004. Effects of *Helicobacter pylori* on endothelial cell proliferation and chemotaxis. *Digestion* 69:201-210.
235. Pellicano, R., M. G. Mazzarello, S. Morelloni, M. Allegri, V. Arena, M. Ferrari, M. Rizzetto, and A. Ponzetto. 1999. Acute myocardial infarction and *Helicobacter pylori* seropositivity. *Int J Clin Lab Res* 29:141-144.
236. Perez-Perez, G. I. 1997. Role of *Helicobacter pylori* infection in the development of pernicious anemia. *Clin Infect Dis* 25:1020-1022.
237. Perez-Perez, G. I., B. M. Dworkin, J. E. Chodos, and M. J. Blaser. 1988. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann Intern Med* 109:11-17.
238. Perri, F., R. Clemente, V. Festa, C. C. De Ambrosio, M. Quitadamo, M. Fusillo, E. Grossi, and A. Andriulli. 1999. Serum tumour necrosis factor-alpha is increased in patients with *Helicobacter pylori* infection and CagA antibodies. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 31:290-294.
239. Perry, E. K., P. H. Gibson, G. Blessed, R. H. Perry, and B. E. Tomlinson. 1977. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci* 34:247-265.
240. Perry, V. H., J. A. Nicoll, and C. Holmes. 2010. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6:193-201.
241. Piacentini, R., L. Civitelli, C. Ripoli, M. E. Marcocci, G. De Chiara, E. Garaci, G. B. Azzena, A. T. Palamara, and C. Grassi. 2010. HSV-1 promotes Ca²⁺-mediated APP phosphorylation and Abeta accumulation in rat cortical neurons. *Neurobiol Aging* 32:2323 e2313-2326.
242. Pieniazek, P., E. Karczewska, A. Duda, W. Tracz, M. Pasowicz, and S. J. Konturek. 1999. Association of *Helicobacter pylori* infection with coronary heart disease. *J Physiol Pharmacol* 50:743-751.
243. Pietri, M., C. Dakowski, S. Hannaoui, A. Alleaume-Butaux, J. Hernandez-Rapp, A. Ragagnin, S. Mouillet-Richard, S. Haik, Y. Bailly, J. M. Peyrin, J. M. Launay, O. Kellermann, and B. Schneider. 2013. PDK1 decreases TACE-mediated alpha-secretase activity and promotes disease progression in prion and Alzheimer's diseases. *Nat Med* 19:1124-1131.
244. Pietropaolo, S., P. Delage, F. Lebreton, W. E. Crusio, and Y. H. Cho. 2012. Early development of social deficits in APP and APP-PS1 mice. *Neurobiol Aging* 33:1002 e1017-1027.

245. Price, A. R., G. Xu, Z. B. Sieminski, L. A. Smithson, D. R. Borchelt, T. E. Golde, and K. M. Felsenstein. 2013. Comment on "ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models". *Science* 340:924-d.
246. Price, J. L., and J. C. Morris. 1999. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45:358-368.
247. Prusiner, S. B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.
248. Quinn, M. J., J. B. Foley, N. T. Mulvihill, J. Lee, P. A. Crean, M. J. Walsh, and C. A. O'Morain. 1999. *Helicobacter pylori* serology in patients with angiographically documented coronary artery disease. *Am J Cardiol* 83:1664-1666, A1666.
249. Rathbone, B., D. Martin, J. Stephens, J. R. Thompson, and N. J. Samani. 1996. *Helicobacter pylori* seropositivity in subjects with acute myocardial infarction. *Heart* 76:308-311.
250. Ridker, P. M., J. Danesh, L. Youngman, R. Collins, M. J. Stampfer, R. Peto, and C. H. Hennekens. 2001. A prospective study of *Helicobacter pylori* seropositivity and the risk for future myocardial infarction among socioeconomically similar U.S. men. *Ann Intern Med* 135:184-188.
251. Ring, R. H., and J. M. Lyons. 2000. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in the late-onset Alzheimer's brain. *J Clin Microbiol* 38:2591-2594.
252. Ritchie, C. W., A. I. Bush, A. Mackinnon, S. Macfarlane, M. Mastwyk, L. MacGregor *et al.* 2003. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol* 60:1685-1691.
253. Rodrigue, K. M., K. M. Kennedy, and D. C. Park. 2009. Beta-amyloid deposition and the aging brain. *Neuropsychol Rev* 19:436-450.
254. Rogers, J., R. Strohmeier, C. J. Kovelowski, and R. Li. 2002. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* 40:260-269.
255. R Roman, G. C., T. K. Tatemichi, T. Erkinjuntti, J. L. Cummings, J. C. Masdeu, J. H. Garcia, L. Amaducci, J. M. Orgogozo, A. Brun, A. Hofman, and *et al.* 1993. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology* 43:250-260.
256. Rosen, W. G., R. C. Mohs, and K. L. Davis. 1984. A new rating scale for Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 141:1356-1364.
257. Roubaud Baudron, C., F. Franceschi, N. Salles, and A. Gasbarrini. 2013. Extragastric diseases and *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 18 Suppl 1:44-51.
258. Russo, F., E. Jirillo, C. Clemente, C. Messa, M. Chiloiro, G. Riezzo, L. Amati, L. Caradonna, and A. Di Leo. 2001. Circulating cytokines and gastrin levels in asymptomatic subjects infected by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). *Immunopharmacol Immunotoxicol* 23:13-24.
259. Sabbagh, M. N., A. Agro, J. Bell, P. S. Aisen, E. Schweizer, and D. Galasko. 2011. PF-04494700, an oral inhibitor of receptor for advanced glycation end products (RAGE), in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 25:206-212.
260. Salama, N. R., G. Otto, L. Tompkins, and S. Falkow. 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect Immun* 69:730-736.
261. Salles, N., L. Letenneur, A. Buissonniere, A. Jehanno, J. F. Dartigues, and F. Megraud. 2010. Does *Helicobacter pylori* affect life expectancy? *J Am Geriatr Soc* 58:1607-1609.

262. Salles-Montaudon, N., S. Dertheil, N. Broutet, N. Gras, L. Monteiro, A. De Mascarel, F. Megraud, and J. P. Emeriau. 2002. Detecting *Helicobacter pylori* infection in hospitalized frail older patients: the challenge. *J Am Geriatr Soc* 50:1674-1680.
263. Salloway, S., R. Sperling, N. C. Fox, K. Blennow, W. Klunk, M. Raskind *et al.* 2014. Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *New Engl J Med* 370:322-333.
264. Sanderson, D. J., A. Gray, A. Simon, A. M. Taylor, R. M. Deacon, P. H. Seeburg, R. Sprengel, M. A. Good, J. N. Rawlins, and D. M. Bannerman. 2007. Deletion of glutamate receptor-A (GluR-A) AMPA receptor subunits impairs one-trial spatial memory. *Behavior Neurosci* 121:559-569.
265. Santana, S., M. Recuero, M. J. Bullido, F. Valdivieso, and J. Aldudo. 2012. Herpes simplex virus type I induces the accumulation of intracellular beta-amyloid in autophagic compartments and the inhibition of the non-amyloidogenic pathway in human neuroblastoma cells. *Neurobiol Aging* 33:430 e419-433.
266. Satoh, H., Y. Saijo, E. Yoshioka, and H. Tsutsui. 2010. *Helicobacter pylori* infection is a significant risk for modified lipid profile in Japanese male subjects. *J Atheroscler Thromb* 17:1041-1048.
267. Saxena, V., H. Markus, S. Swaminathan, and M. E. Mendall. 1997. Hyperhomocysteinaemia, *Helicobacter pylori*, and coronary heart disease. *Heart* 78:524.
268. Schaeffer, S., F. Le Doze, V. De la Sayette, F. Bertran, and F. Viader. 1994. Dementia in Lyme disease. *Presse Med* 23:861.
269. Scheff, S. W., and D. A. Price. 2003. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging* 24:1029-1046.
270. Schellenberg, G. D., T. D. Bird, E. M. Wijsman, H. T. Orr, L. Anderson, E. Nemens, J. A. White, L. Bonnycastle, J. L. Weber, M. E. Alonso *et al.* 1992. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258:668-671.
271. Schmidt, R., H. Schmidt, J. D. Curb, K. Masaki, L. R. White, and L. J. Launer. 2002. Early inflammation and dementia: a 25-year follow-up of the Honolulu-Asia Aging Study. *Ann Neurol* 52:168-174.
272. Selkoe, D. J. 2001. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis* 3:75-80.
273. Seshadri, S., A. Beiser, J. Selhub, P. F. Jacques, I. H. Rosenberg, R. B. D'Agostino, P. W. Wilson, and P. A. Wolf. 2002. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 346:476-483.
274. Sessa, R., M. Nicoletti, M. Di Pietro, G. Schiavoni, I. Santino, C. Zagaglia, M. Del Piano, and P. Cipriani. 2009. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: current state and future perspectives. *Internat J Immunopathol Pharmacol* 22:9-14.
275. Sheng, J. G., S. H. Bora, G. Xu, D. R. Borchelt, D. L. Price, and V. E. Koliatsos. 2003. Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APPswe transgenic mice. *Neurobiol Dis* 14:133-145.
276. Shi, W. J., W. Liu, X. Y. Zhou, F. Ye, and G. X. Zhang. 2013. Associations of *Helicobacter pylori* infection and cytotoxin-associated gene A status with autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. *Thyroid* 23:1294-1300.
277. Shiota, S., K. Murakami, A. Yoshiiwa, K. Yamamoto, S. Ohno, A. Kuroda, K. Mizukami, K. Hanada, T. Okimoto, M. Kodama, K. Abe, Y. Yamaoka, and T. Fujioka. 2011. The

- relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer's disease in Japan. *J neurol* 258:1460-3
278. Singh, R. K., A. D. McMahon, H. Patel, C. J. Packard, B. J. Rathbone, and N. J. Samani. 2002. Prospective analysis of the association of infection with CagA bearing strains of *Helicobacter pylori* and coronary heart disease. *Heart* 88:43-46.
 279. Skoog, I., B. Lernfelt, S. Landahl, B. Palmertz, L. A. Andreasson, L. Nilsson, G. Persson, A. Oden, and A. Svanborg. 1996. 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet* 347:1141-1145.
 280. Soler, J. A., M. Guell, M. Briculle, A. Gavarro, I. Roig, J. Sanchez, J. P. Gisbert, P. Garcia, A. Villoria, and X. Calvet. 2009. *H. pylori* eradication does not reduce paraprotein levels in monoclonal gammopathy of unknown significance (MGUS): a prospective cohort study. *Ann Hematol* 88:769-773.
 281. Soulet, D., and S. Rivest. 2008. Bone-marrow-derived microglia: myth or reality? *Curr Opin Pharmacol* 8:508-518.
 282. Stohr, J., J. C. Watts, Z. L. Mensinger, A. Oehler, S. K. Grillo, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and K. Giles. 2012. Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (Abeta) prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:11025-11030.
 283. Stone, A. F., M. A. Mendall, J. C. Kaski, T. M. Edger, P. Risley, J. Poloniecki, A. J. Camm, and T. C. Northfield. 2002. Effect of treatment for *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina (STAMINA). *Circulation* 106:1219-1223.
 284. Strachan, D. P., M. A. Mendall, D. Carrington, B. K. Butland, J. W. Yarnell, P. M. Sweetnam, and P. C. Elwood. 1998. Relation of *Helicobacter pylori* infection to 13-year mortality and incident ischemic heart disease in the caerphilly prospective heart disease study. *Circulation* 98:1286-1290.
 285. Suerbaum, S., and P. Michetti. 2002. *Helicobacter pylori* infection. *New Engl J Med* 347:1175-1186.
 286. Sundstrom, A., L. G. Nilsson, M. Cruts, R. Adolfsson, C. Van Broeckhoven, and L. Nyberg. 2007. Increased risk of dementia following mild head injury for carriers but not for non-carriers of the APOE epsilon4 allele. *Int Psychogeriatr* 19:159-165.
 287. Sy, M., M. Kitazawa, R. Medeiros, L. Whitman, D. Cheng, T. E. Lane, and F. M. Laferla. 2011. Inflammation induced by infection potentiates tau pathological features in transgenic mice. *Am J Pathol* 178:2811-2822.
 288. Takahashi, T., T. Yujiri, K. Shinohara, Y. Inoue, Y. Sato, Y. Fujii, M. Okubo, Y. Zaitzu, K. Ariyoshi, Y. Nakamura, R. Nawata, Y. Oka, M. Shirai, and Y. Tanizawa. 2004. Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 124:91-96.
 289. Takeda, S., N. Sato, K. Ikimura, H. Nishino, H. Rakugi, and R. Morishita. 2013. Increased blood-brain barrier vulnerability to systemic inflammation in an Alzheimer disease mouse model. *Neurobiol Aging* 34:2064-2070.
 290. Tan, Z. S., A. S. Beiser, R. S. Vasan, R. Roubenoff, C. A. Dinarello, T. B. Harris, E. J. Benjamin, R. Au, D. P. Kiel, P. A. Wolf, and S. Seshadri. 2007. Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study. *Neurology* 68:1902-1908.

291. Taylor, G. S., I. B. Vipond, I. D. Paul, S. Matthews, G. K. Wilcock, and E. O. Caul. 2002. Failure to correlate *C. pneumoniae* with late onset Alzheimer's disease. *Neurology* 59:142-143.
292. Tesseur, I., A. C. Lo, A. Roberfroid, S. Dietvorst, B. Van Broeck, M. Borgers, H. Gijzen, D. Moechars, M. Mercken, J. Kemp, R. D'Hooge, and B. De Strooper. 2013. Comment on "ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models". *Science* 340:924-e.
293. Thinakaran, G., and E. H. Koo. 2008. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615-29619.
294. Tobin, N. P., G. T. Henahan, R. P. Murphy, J. C. Atherton, A. F. Guinan, S. W. Kerrigan, D. Cox, P. A. Cahill, and P. M. Cummins. 2008. *Helicobacter pylori*-induced inhibition of vascular endothelial cell functions: a role for VacA-dependent nitric oxide reduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H1403-1413.
295. Tobinick, E. L., and H. Gross. 2008. Rapid improvement in verbal fluency and aphasia following perispinal etanercept in Alzheimer's disease. *BMC Neurol* 8:27.
296. Tohda, S., and T. Ohkusa. 2000. Resolution of refractory idiopathic thrombocytopenic purpura after eradication of *Helicobacter pylori*. *Am J Hematol* 65:329-330.
297. Tomiyama, T., A. Shoji, K. Kataoka, Y. Suwa, S. Asano, H. Kaneko, and N. Endo. 1996. Inhibition of amyloid beta protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin. Its possible function as a hydroxyl radical scavenger. *J Biol Chem* 271:6839-6844.
298. Tomlinson, B. E. 1977. The pathology of dementia. *Contemp Neurol Ser* 15:113-153.
299. Torgano, G., R. Cosentini, C. Mandelli, R. Perondi, F. Blasi, G. Bertinieri, T. V. Tien, G. Ceriani, P. Tarsia, C. Arosio, and M. L. Ranzi. 1999. Treatment of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections decreases fibrinogen plasma level in patients with ischemic heart disease. *Circulation* 99:1555-1559.
300. Tsumoto, C., K. Tominaga, H. Okazaki, T. Tanigawa, H. Yamagami, K. Watanabe, T. Nakao, K. Koh, T. Watanabe, Y. Fujiwara, T. Yamane, N. Oshitani, M. Hino, K. Higuchi, and T. Arakawa. 2009. Long-term efficacy of *Helicobacter pylori* eradication in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: 7-year follow-up prospective study. *Ann Hematol* 88:789-793.
301. Urosevic, N., and R. N. Martins. 2008. Infection and Alzheimer's disease: the APOE epsilon4 connection and lipid metabolism. *J Alzheimers Dis* 13:421-435.
302. Vahdat, K., M. R. Pourbehi, A. Ostovar, F. Hadavand, A. Bolkheir, M. Assadi, M. Farrokhnia, and I. Nabipour. 2013. Association of pathogen burden and hypertension: the Persian Gulf Healthy Heart Study. *Am J Hypertens* 26:1140-1147.
303. Vaira, D., A. Zullo, N. Vakil, L. Gatta, C. Ricci, F. Perna, C. Hassan, V. Bernabucci, A. Tampieri, and S. Morini. 2007. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomized trial. *Ann Intern Med* 146:556-563.
304. Valenzuela, M. J., and P. Sachdev. 2006. Brain reserve and dementia: a systematic review. *Psychol Med* 36:441-454.
305. Van de Bovenkamp, J. H., J. Mahdavi, A. M. Korteland-Van Male, H. A. Buller, A. W. Einerhand, T. Boren, and J. Dekker. 2003. The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Helicobacter* 8:521-532.
306. Varon, C., P. Dubus, F. Mazurier, C. Asencio, L. Chambonnier, J. Ferrand, A. Giese, N. Senant-Dugot, M. Carlotti, and F. Megraud. 2012. *Helicobacter pylori* infection recruits bone marrow-derived cells that participate in gastric preneoplasia in mice. *Gastroenterology* 142:281-291.

307. Veeraraghavalu, K., C. Zhang, S. Miller, J. K. Hefendehl, T. W. Rajapaksha, J. Ulrich, M. Jucker, D. M. Holtzman, R. E. Tanzi, R. Vassar, and S. S. Sisodia. 2013. Comment on "ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models". *Science* 340:924
308. Veneri, D., G. De Matteis, P. Solero, F. Federici, C. Zanuso, E. Guizzardi, S. Arena, M. Gaio, P. Pontiero, M. M. Ricetti, and M. Franchini. 2005. Analysis of B- and T-cell clonality and HLA class II alleles in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: correlation with *Helicobacter pylori* infection and response to eradication treatment. *Platelets* 16:307-311.
309. Veneri, D., M. Franchini, M. Gottardi, M. D'Adda, A. Ambrosetti, M. Krampera, F. Zanetti, and G. Pizzolo. 2002. Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication in raising platelet count in adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 87:1177-1179.
310. Veneri, D., M. Gottardi, E. Guizzardi, C. Zanuso, M. Krampera, and M. Franchini. 2002. Idiopathic thrombocytopenic purpura, *Helicobacter pylori* infection, and HLA class II alleles. *Blood* 100:1925-1926; author reply 1926-1927.
311. Veneri, D., M. Krampera, and M. Franchini. 2004. *Helicobacter pylori* infection and idiopathic thrombocytopenic purpura: description of 21 newly diagnosed cases. *Haematologica* 89:08.
312. Veneri, D., M. Krampera, and M. Franchini. 2005. High prevalence of sustained remission of idiopathic thrombocytopenic purpura after *Helicobacter pylori* eradication: a long-term follow-up study. *Platelets* 16:117-119.
313. Vermeer, S. E., N. D. Prins, T. den Heijer, A. Hofman, P. J. Koudstaal, and M. M. Breteler. 2003. Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *New Engl J Med* 348:1215-1222.
314. Viswanathan, A., W. A. Rocca, and C. Tzourio. 2009. Vascular risk factors and dementia: how to move forward? *Neurology* 72:368-374.
315. Vlad, S. C., D. R. Miller, N. W. Kowall, and D. T. Felson. 2008. Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology* 70:1672-1677.
316. Wald, N. J., M. R. Law, J. K. Morris, and A. M. Bagnall. 1997. *Helicobacter pylori* infection and mortality from ischaemic heart disease: negative result from a large, prospective study. *Br Med J* 315:1199-1201.
317. Walsh, D. M., I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan, and D. J. Selkoe. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-539.
318. Wang, W. M., C. Y. Chen, C. M. Jan, L. T. Chen, D. S. Perng, S. R. Lin, and C. S. Liu. 1994. Long-term follow-up and serological study after triple therapy of *Helicobacter pylori*-associated duodenal ulcer. *Am J Gastroenterol* 89:1793-1796.
319. Wang, Z. W., Y. Li, L. Y. Huang, Q. K. Guan, W. Xu da, W. K. Zhou, and X. Z. Zhang. 2012. *Helicobacter pylori* infection contributes to high risk of ischemic stroke: evidence from a meta-analysis. *J Neurol* 259:2527-2537.
320. Whincup, P., J. Danesh, M. Walker, L. Lennon, A. Thomson, P. Appleby, C. Hawkey, and J. Atherton. 2000. Prospective study of potentially virulent strains of *Helicobacter pylori* and coronary heart disease in middle-aged men. *Circulation* 101:1647-1652.
321. Whincup, P. H., M. A. Mendall, I. J. Perry, and D. P. Strachan. 1997. Hyperhomocysteinaemia, *Helicobacter pylori*, and coronary heart disease. *Heart* 78:524.

322. Whitehouse, P. J., D. L. Price, R. G. Struble, A. W. Clark, J. T. Coyle, and M. R. Delon. 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215:1237-1239.
323. Wong, B. C., S. K. Lam, W. M. Wong, J. S. Chen, T. T. Zheng, R. E. Feng, K. C. Lai, W. H. Hu, S. T. Yuen, S. Y. Leung, D. Y. Fong, J. Ho, C. K. Ching, and J. S. Chen. 2004. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 291:187-194.
324. Wozniak, M. A., A. L. Frost, C. M. Preston, and R. F. Itzhaki. 2011. Antivirals reduce the formation of key Alzheimer's disease molecules in cell cultures acutely infected with herpes simplex virus type 1. *PLoS One* 6:e25152.
325. Wozniak, M. A., and R. F. Itzhaki. 2013. Intravenous immunoglobulin reduces beta amyloid and abnormal tau formation caused by herpes simplex virus type 1. *J Neuroimmunol* 257:7-12.
326. Wozniak, M. A., R. F. Itzhaki, S. J. Shipley, and C. B. Dobson. 2007. Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation. *Neurosci Lett* 429:95-100.
327. Wozniak, M. A., A. P. Mee, and R. F. Itzhaki. 2009. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J Pathol* 217:131-138.
328. Yoshimura, S., N. Isobe, T. Matsushita, T. Yonekawa, K. Masaki, S. Sato, Y. Kawano, and J. Kira. 2013. Distinct genetic and infectious profiles in Japanese neuromyelitis optica patients according to anti-aquaporin 4 antibody status. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:29-34.
329. Yoshiyama, H., H. Nakamura, M. Kimoto, K. Okita, and T. Nakazawa. 1999. Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *J Gastroenterol* 34:18-23.
330. Yuan, W., Y. Li, K. Yang, B. Ma, Q. Guan, D. Wang, and L. Yang. 2010. Iron deficiency anemia in *Helicobacter pylori* infection: meta-analysis of randomized controlled trials. *Scand J Gastroenterol* 45:665-676.
331. Zambrano, A., L. Solis, N. Salvadores, M. Cortes, R. Lerchundi, and C. Otth. 2008. Neuronal cytoskeletal dynamic modification and neurodegeneration induced by infection with herpes simplex virus type 1. *J Alzheimers Dis* 14:259-269.
332. Zavos, C., J. Kountouras, G. Sakkias, I. Venizelos, G. Deretzi, and S. Arapoglou. 2012. Histological presence of *Helicobacter pylori* bacteria in the trabeculum and iris of patients with primary open-angle glaucoma. *Ophthalmic Res* 47:150-156.
333. Zerr, I., M. Helmhold, S. Poser, V. W. Armstrong, and T. Weber. 1996. Apolipoprotein E phenotype frequency and cerebrospinal fluid concentration are not associated with Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 53:1233-1238.
334. Zhou, D., J. D. Wang, M. Z. Weng, Y. Zhang, X. F. Wang, W. Gong, and Z. W. Quan. 2013. Infections of *Helicobacter* spp. in the biliary system are associated with biliary tract cancer: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 25:447-454.
335. Zhou, X., J. Wu, and G. Zhang. 2013. Association between *Helicobacter pylori* and asthma: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 25:460-468.
336. Zhou, X., C. Zhang, J. Wu, and G. Zhang. 2013. Association between *Helicobacter pylori* infection and diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetes Res Clin Pract* 99:200-208.
337. Zlokovic, B. V. 2013. Cerebrovascular effects of apolipoprotein E: implications for Alzheimer disease. *JAMA Neurol* 70:440-444.

- 338. Zotova, E., J. A. Nicoll, R. Kalaria, C. Holmes, and D. Boche. 2010. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Alzheimers Res Ther* 2:1.
- 339. Zullo, A., V. De Francesco, C. Hassan, S. Morini, and D. Vaira. 2007. The sequential therapy regimen for *Helicobacter pylori* eradication: a pooled-data analysis. *Gut* 56:1353-1357.